

部分肝切除マウスにおける残存肝への血小板集積機構とその肝再生における役割の解明

著者	阿部 隆之
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54878

博士論文

部分肝切除マウスにおける残存肝への 血小板集積機構とその肝再生における役割の解明

東北大学医学部医学研究科病態科学系専攻（第2外科）

阿部 隆之

部分肝切除マウスにおける残存肝への 血小板集積機構とその肝再生における役割の解明

東北大学医学部医学研究科病態科学系専攻（第2外科）

阿部 隆之

【要約】

[背景および目的] マウスにlipopolysaccharide(LPS)を投与すると、早期に肝へ血小板が集積し、クッパー細胞を除去すると、この血小板集積は生じなくなることが知られている。今回、肝切除後の残存肝における血小板集積について検討し、その意義、役割を明らかにするため、以下の検討を行った。[方法と結果] i).部分肝切除マウスにおいて、術後残存肝へ血小板が集積するかを、抗血小板蛍光免疫染色、電顕および肝内セロトニン(5HT)濃度で評価した。肝切後4hrの蛍光免疫染色では肝内に著しい血小板の発色を認めた。電顕では類洞内に集積する多数の血小板を認め、一部の血小板はディッセ腔に入り、肝実質細胞と接触する様な所見を認めた。これらの所見と相関して、肝5HTは術前 $1.29 \pm 0.14 \text{ nmol/g}$ (以下単位省略) から4hr後に 2.27 ± 0.32 まで上昇した。以上より肝切除後も肝内血小板集積が起こることが証明された。ii).クッパー細胞を除去した場合、血小板集積が抑制されるか否かを、ジクロロメチレンビスホスホネート (Cl_2MBP) 含有リボソームを投与してクッパー細胞 (KC) を除去したマウスで検討した。KCを除去したマウスでは、肝切を行っても、抗血小板免疫染色での血小板の発色は抑制されており、肝5HTも有意な上昇を認めなかったことから、肝切後はクッパー細胞を介して、肝内血小板集積が惹起されることが明らかとなった。iii).肝内に集積した血小板は、肝再生において、どのような作用をするかを検討した。血小板の役割をより詳細に解明するため、KC除去マウスの他に、抗血小板抗体を用いて血小板減少マウスを作製し、生食投与群と比較した。肝再生の評価はPCNA陽性率と肝体重比を測定した。PCNA陽性率は生食投与群が36hr後にピークとなるの対し、KC除去群、血小板減少群では48hrと遅れ、最高値も低値であった。その結果、再生肝体重比の回復は遅延した。iv).抗凝固薬で血小板の集積が抑制されるかを検討したが、肝内血小板の集積に抗凝固薬は無効であった。

[結論] 以上の結果より、部分肝切除後には、血液凝固とは違う機序で、クッパー細胞を介して類洞内に血小板が集積することが明らかになった。また、集積した血小板は肝再生において重要な働きをしている可能性が示唆された。

【背景】

肝切除症例は年々増加しているが、肝切除量は残存肝の予備力により決定され、十分な外科治療が行えない症例が少なくない。肝切除を必要とするのは肝硬変、慢性肝炎等の基礎疾患を持つ症例が多く、これらの患者では肝自体の予備能が低下しているうえ、再生能も低下している。肝再生促進法を開発することは外科治療の適応拡大に大きく寄与するが、そのためにはいまだ不明な点が多い肝再生の機序について解明することが不可欠である。

近年、肝細胞増殖や肝切後の肝再生に関与する多種の因子が同定されてきており、こうした因子のいくつかは、炎症性反応によって惹起されるものもあることが分かってきた。Endoら¹⁾は少量のLPSを投与し、全身的に炎症を誘発した際、早期に肝組織中セロトニン(5-hydroxytryptamine, 以下5HT)が上昇することを明らかにした。血中での血小板数の減少と血中5-HTの低下が相関し、また、血中5-HTの低下と肝組織5-HTの上昇はほぼ一致することから、LPS投与後の肝5-HTの上昇は血小板の肝集積によることが証明された²⁾。電子顕微鏡所見でも肝類洞に多数の血小板を認め、これら血小板は血液凝固の際に見られるような脱顆粒はなく、フィブリン沈着や血管内皮傷害もないことから、血液凝固反応とは違う機序で集積している可能性が考えられた。また、血小板はクッパー細胞と接触し、一部はディッセ腔に侵入、さらには“肝細胞内”にも血小板が存在していた³⁾。このような所見はこれまで報告がなく、どのような理由で血小板が肝細胞内に存在するのか、興味を持たれるところである。

肝疾患では種々の血球や造血の異常を伴うことが知られており、特に血小板の数や機能に異常を来すことは、従来より言われてきた。また、肝切除後に一時的に血小板数が低下する⁴⁾ことも、報告されている。しかし、こうした血小板動態の生理的意義については、未だ不明である。近年、血小板には多種の増殖因子が含まれることが報告されており、その多機能性が明らかとなっているにもかかわらず、実際の肝病態において凝固能以外の機能を発現しているという報告はほとんどない。肝再生に関しても同様である。そこで今回、血小板と肝再生の関連を明らかにする目的で実験を行った。

【目的】

肝切除後、残存肝に血小板が集積するのか、また、集積する場合、肝再生と何らかの関連があるのではないかと推測された。そこで今回、以下の4点について実験を行った。1) 肝切除において、血小板の集積が認められるか。2) 部分肝切除後に肝内への血小板の集積が惹起されるとすれば、どのような機序で血小板が集まるのか。また、その集積へクッパー細胞が関与するのか。3) クッパー細胞や血小板を除去し部分肝切除を行った場合、肝再生はどのような影響を受けるか。4) 部分肝切除後の肝内血小板集積は、抗凝固薬で抑制されるのか。

以上の検討から、血小板と肝再生との関連を明らかにすることが本研究の目的である。

【方法】

対象動物

東北大学医学部マウスセンターより供給されたBALB/c6週齢、雄性マウスを2週間の馴化飼育期間をおき8週齢で実験に用いた。エーテル麻酔下に、70%肝切除は外側左葉、内側左葉、内側右葉の3葉を一括結紮、切除を行った。Sham手術については、開腹し切除予定肝を腹腔外に出し、還納、閉腹した。すべての実験は東北大学実験動物取り扱いガイドラインに従って行った。

血中及び肝組織中5HT濃度の測定⁵⁾

断頭後、約3滴の血液を冷5HT抽出液(0.4M HClO_4 、2mMEDTA-2Na、0.1%塩酸システインを含む)3ml中に滴下し、直ちに血液重量(mg)を計ってホモジェナイズし、血球を破碎した。遠心後、上清を2MKOHにてpH4~6に中和し、さらに遠心を行った。上清1mlを0.01Mリン酸緩衝液(PH6.2)で平衡化したリン酸セルロースカラムに流し、4mlのリン酸緩衝液で洗浄後、0.1%塩酸システインを含む0.1MHCl1.5mlで5HTを溶出した。溶出液は濃塩酸2mlを添加後、o-フタルアルデヒド(生化学工業、東京)と反応させ、蛍光強度を測定し、単位重量あたりの5HT濃度を算出した。肝組織については、断頭後直ちに肝を摘出し、切断部、壊死部をとりのぞいて、ドライアイスで凍結し、-80℃に保存した。肝組織中5HT測定時には肝組織0.3gに上記の冷5HT抽出液3mlを加え、以下、同様の測定を行った。

血中血小板数の計測

血中血球数測定には動物用セルタックMEK-6158(日本光電、東京)を使用した。断頭後、血液を100 μl を採取し、0.1mgEDTA-2Naを溶解し、同量のセルタック用希釈液で2倍に希釈し、血小板の凝集を防ぐため、測定まで室温で振盪した。剖検から2時間以内で測定をおこなった。

電子顕微鏡病理所見

断頭後、直ちに肝を摘出し、小片に細切、2%グルタルアルデヒド及び2%パラホルムアルデヒド含有0.1Mカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4) で組織固定を行った。類洞内血小板が流出する可能性があったため、灌流固定は行わなかった。1%四酸化オスミウムで後固定の後、1%酢酸ウラン、4℃で1時間ブロック染色を行った。その後、エタノールで段階的に脱水後、酸化プロピレンで透徹し、EPON812で包埋した。超薄切切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を行い、透過型電子顕微鏡 (H-700、日立) にて観察した。

血小板減少モデルの作製

抗マウス血小板抗体Pm-1を用いて血小板減少マウスを作製した⁶⁾。Pm-1は100 μ g/Bodyを腹腔内投与し、24時間後に部分肝切除を行った。

抗マウス血小板抗体Pm-1の調整

抗マウス血小板抗体は筑波大学血液内科学教室、長澤俊郎先生より供与していただいた抗マウス血小板モノクローナル抗体 (Pm-1) 産生ハイブリドーマ⁷⁾を用いて、調整した。ハイブリドーマをRPMI1640培養液で増殖後、リン酸緩衝生食 (PBS) で洗浄し、同液に再懸濁、6週齢ヌードマウス (BALB/cAnN Crj-nu) の腹腔内に 1×10^7 個を投与した。3週間後、貯留した腹水を採取、遠心し、上清に飽和硫酸アンモニウムを同量混和し、高速遠心した。沈殿物を回収し、少量のPBSに再溶解後、硫酸アンモニウムを除去するため、PBSにて5回の透析を行った。IgG濃度は $OD_{280}/1.4$ (mg/ml)で求めた。

抗血小板抗体Pm-1による肝内集積血小板の免疫蛍光染色

摘出肝は直ちに適当な大きさに切り出した後、OCTコンパウンド（サクラ精機、東京）に浸し、液体窒素中で急速凍結した。これより厚さ6 μ mの凍結切片を作製し、風乾後、間接免疫蛍光染色を行った。冷アセトン固定後、10%正常ヤギ血清を30分かけた後、1次抗体として抗血小板抗体Pm-1を100 μ g/mlに希釈し、1時間室温でインキュベートした。2次抗体にはFITC標識ヤギ抗ラットIgG抗体（Organon Teknika, Belgium）をかけ、45分後に洗浄し、ベクタシールド（フナコシ、東京）で封入した。染色標本は μ Radiance共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡（MR/AG-1、日本バイオ・ラッド、東京）にて観察した。

クッパー細胞の除去

ジクロロメチレンビスホスホネート（Cl₂MBP）はBoehringer Mannheim（Mannheim, Germany）より供与を受けた。Cl₂MBP包埋リポソームはVan Rooijinら⁸⁾の方法に一部、Klaus Tschakowskyら⁹⁾の製法を参考にした改良を加えて、製造した。丸底フラスコ内でコレステロール（Sigma co, St. Louis, U.S.A.）11mg、ホスファチジルコリン（Sigma co, St. Louis, U.S.A.）75mgをクロロホルム（同仁化学、熊本）20mlに溶解し、これをロータリーエバポレーターに接続した。37℃にて回転させながら、フラスコ内を150~200mmHgまで減圧し、クロロホルムを蒸散させた。フラスコの内面に薄膜が形成されるので、ここにCl₂MBP-PBS溶液（0.2g/ml）を10ml加え、68℃の恒温槽で1時間振盪した。リポソームの酸化を防ぐため、窒素ガス封入下で2時間静置した後、0.6 μ mのフィルターで濾過し、4℃に保存した。使用前に遠心し、リポソームに封入されなかったCl₂MBP-PBS溶液を除去し、さらにPBSで2回洗浄し、最終的に8mlPBSに懸濁した。マウス1匹あたり2ml/kgで尾静脈より投与し、48時間後に部分肝切除を行った。

クッパー細胞除去の確認

Cl₂MBP包埋リポソーム投与後、48時間後のマウス肝のクッパー細胞の有無は免疫染色を行い、確認した。摘出肝は直ちに適当な大きさに切り出した後、OCTコンパウンドに浸し、液体窒素中で急速凍結。これより6 μ mの凍結切片を作製し、冷アセトンにて固定した。内因性ペルオキシダーゼの不活性化後、10%正常ヤギ血清を30分かけ、その後100倍希釈したF4/80モノクローナル抗体 (Serotec Ltd., Oxford, England) を4℃で1昼夜おいた後、PBS洗浄し、2次抗体 (ヤギ抗ラットIgG抗体: Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, U.S.A.) を滴下後1時間おいて洗浄し、ABC (avidine-biotin complex) reagent (Vector Lab., Burlingame, CA, U.S.A.) を30分間かけ、最終的にジアミノベンジジンで発色させた。生食投与群マウスの肝組織を陽性コントロールとして用いた。

PCNA(proliferating cell nuclear antigen)免疫染色および陽性率の測定

残存肝の外側右葉と尾状突起から各1ヶ検体を切り出し、4%パラホルムアルデヒド固定後パラフィン包埋した。6 μ mに切り出した後、脱パラフィンし、内因性ペルオキシダーゼをブロックした。次いで、ビオチン標識抗PCNA抗体 (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.) を室温、1時間、結合させて洗浄、ABC reagentに30分間晒し、ジアミノベンジジンで発色させた。外側右葉と尾状突起のそれぞれ肝細胞1000個に対して、PCNA陽性細胞数をカウントし、%表示した。

血中AST、ALTの測定

ディスクリット方式自動分析装置、COBAS-MIRA (日本ロシュ、東京) で測定した。

実験1 70%部分肝切除マウスにおける残存肝への5HTの集積の検討

約70%肝切除群（Hx群）とSham手術群（Sh群）について、下記の比較検討をおこなった。

- 1.肝切24時間後までの血中血小板数および血中5HT濃度の推移。
- 2.肝切24時間後までの肝組織中5HT濃度の推移。
- 3.抗血小板抗体を用いた免疫蛍光染色による血小板集積の程度。
- 4.電顕病理検査所見。

実験2 部分肝切除後の残存肝血小板集積に対するクッパー細胞の関与についての検討

生食投与後部分肝切除群（Hx群）とクッパー細胞除去後部分肝切除群（Kd群）について、下記の検討を行った。

- 1.術後24時間までの血中血小板数および血中5HT濃度の推移。
- 2.肝組織中5HT濃度の推移。
- 3.抗血小板抗体免疫蛍光染色による血小板集積の程度。

実験3 クッパー細胞除去と血小板減少の肝再生への影響の検討

まず予備実験において、1.抗血小板抗体Pm-1で血小板減少以外の副作用がないことを確認するため①血算および②血中AST・ALTを測定した。また、部分肝切後の肝内血小板集積が無いことを確認するため、2.血小板減少群（Tp群）において①血中5HT濃度と血小板数の測定、②肝組織中5HT濃度および、③抗血小板抗体免疫蛍光染色を行った。

続いて、肝再生を比較するため、生食投与後部分肝切除群（Hx群）、クッパー細胞除去後部分肝切除群（Kd群）および血小板減少後肝切除群（Tp群）の3群について、各群とも術後0～120hrまで、以下の検討を行った。

1. 血中ALTの測定

2. 残存肝のPCNA陽性率の測定

3. 再生肝体重比の推移

実験4 部分肝切除後の残存肝血小板集積におよぼす抗凝固剤の影響の検討

a. Hp群（ヘパリン200単位/kgBWを、術前5分前に尾静脈投与した群）

b. Asp群（アスピリン100mg/kgBWを術前1時間前に腹腔内投与した群）

c. Oky群（トロンボキサンA2合成阻害薬OKY-046、50mg/kgBWを術前30分前に腹腔内投与した群）

d. Mn群（プロテアーゼ阻害薬のメシル酸ナファモスタット5mg/kgBWを術前30分前に尾静脈投与した群）

上記の4群に対し、70%部分肝切除を施行し、4時間後に肝を摘出し、肝組織中5HT濃度を比較した。陽性コントロールとして術前生食投与の部分肝切除群（Hx群）を、陰性コントロールとして無処置マウス群（Nt群）を、同時に測定した。

統計学的検討

各測定結果を、平均値±標準偏差（Mean±SD）で表した。検定は分散分析法で行い、 $P<0.05$ で有意差を認めた場合、個々の結果についてScheffe's F法で多重比較を行った。

【結果】

実験1 70%部分肝切除マウスにおける残存肝への5HTの集積

1. 血中5HT濃度と血小板数の推移

約70%肝切除群（Hx群：図1）とSham手術群（Sh群：図2）とも、血中5HT濃度と血小板数は経時的に同様の動態を示した。無処置マウスの血中血小板数は $83.7 \pm 5.5 \times 10^4/\mu\text{l}$ であった。部分肝切除後は血中血小板数は減少し、12時間の段階で $63.5 \pm 4.8 \times 10^4/\mu\text{l}$ まで低下し、以後は漸減・漸増なく推移した。Sh群では、術後に血中血小板数、血中5HT濃度とも若干上昇する傾向にあった。

2. 肝組織中5HT濃度の推移（図3）

正常マウスの肝組織中5HT濃度は $1.29 \pm 0.14 \text{ nmol/g}$ であったが、Hx群では術後急増し、4時間の時点では $2.27 \pm 0.32 \text{ nmol/g}$ で、その後漸減していった。これに対し、Sh群では、肝組織中5HT濃度は上昇せず、以後24時間まで有意にHx群が高値であった。

3. 抗血小板抗体免疫蛍光染色（図4）

Sh群の肝組織内にはごく少数の血小板しか同定できないのに対し、Hx群では、肝組織内に血小板の蛍光発色が集簇性に多数、認められた。

4. 電顕病理所見

部分肝切除後4時間の肝類洞には多数の血小板を認め、これらはほとんどが細胞内顆粒を保持しており、血液凝固に見られる脱顆粒像はなかった。一部の血小板は類洞基底膜を越え、ディッセ腔に存在し、肝実質細胞に触手様の突起をのばして接触しているものもあった（図5）。クッパー細胞は貪食像を認め、活性化した所見で、同細胞に囲まれディッセ腔に存在する血小板を認めた（図6）。類洞内にフィブリン沈着はなく、類洞内皮細胞も良く形態が保たれ、肝実質細胞にも傷害を受けた所見はなかった。

実験2 部分肝切除後の残存肝血小板集積に関わるクッパー細胞の働き

Kd群 (Cl₂MBP包埋リポソーム投与後、48時間) のマウス肝はF4/80免疫染色にて、クッパー細胞が消滅していることを確認した (図7)。

1. 血中5HT濃度と血中血小板数の推移 (図8)

血中5HT濃度と血中血小板数は、相関する経時的推移を示した。Kd群の血中5HT濃度はHx群より低い傾向にあった。

2. 肝組織中5HT濃度の推移 (図9)

Kd群の術前肝組織中5HT濃度は $1.19 \pm 0.23 \text{ nmol/g}$ であった。肝切除後4時間までわずかな上昇 ($1.46 \pm 0.14 \text{ nmol/g}$) を認めたが、有意な変化ではなく、Hx群より有意差をもって低値であった。

3. 抗血小板抗体免疫蛍光染色 (図10)

Hx群に比べ、Kd群の血小板の発色数は少数で、明らかに血小板の集積が低下している所見であった。

実験3 クッパー細胞除去と血小板減少が肝再生におよぼす影響

予備実験

1. 抗血小板抗体Pm-1投与による副作用

① 血小板減少群 (Tp群) における血算の推移 (図11)

正常マウスの血中血小板数は $83.7 \pm 5.5 \times 10^4 / \mu\text{l}$ であった。抗血小板抗体Pm-1を投与すると、24時間で血小板数は $6.27 \pm 0.23 \times 10^4 / \mu\text{l}$ まで低下した。以後は漸増していき、96時間以降は正常値よりも高値となった。赤血球数、白血球数には有意な変動はなかった。

②血清AST・ALT値の推移 (図12)

血清ASTおよびALTに有意な変動はなかった。

2.血小板減少群 (Tp群) における肝内血小板集積の確認

①血中血小板数と血中5HT濃度の推移 (図13)

血中血小板数は術前 $8.76 \pm 0.93 \times 10^4 / \mu\text{l}$ で術後も上昇することはなかった。術前の血中5HT濃度は $0.14 \pm 0.07 \text{ nmol/g}$ と非常に低値で、術後も有意な変動はなかった。

②肝組織中5HT濃度の推移 (図14)

術前の肝組織中5HT濃度は $0.41 \pm 0.18 \text{ nmol/g}$ で、肝切除後も有意な上昇を認めなかった。

③抗血小板抗体免疫蛍光染色 (図15)

Tp群では、肝切後4時間の肝内血小板の発色数はHx群に比べ少数で、Kd群と同程度であった。

Hx群、Kd群、Tp群における肝再生の比較

1.血清ALT値の推移 (図16)

血清ALT値はHx群、Kd群、Tp群とも術後12時間で3000U/l以上の最高値となり、以後低下した。各時間におけるALT値は3群間に有意差を認めなかった。

2.残存肝におけるPCNA陽性率の推移 (図17、図18)

Hx群ではもっとも高値を示したのは、術後36時間の時点で、陽性率は $42.0 \pm 7.6\%$ であった。この時点でKd群は $18.9 \pm 8.1\%$ 、Tp群は $28.1 \pm 7.1\%$ と有意に低値であった。Kd群、Tp群が最高値をとったのはHx群より遅れて術後48時間で、それぞれ $28.5 \pm 9.5\%$ 、 $31.5 \pm 8.6\%$ であったが、同じ術後48時間でのHx群の値、 $38.5 \pm 7.9\%$ よりも低値であった。

3.再生肝体重比の推移 (図19、図20)

術後24時間までの各群の肝体重比に有意さはなかったが、Kd群では48時間以降、Hx群よりも有意に低値で、Hx群が96時間でほぼ正常肝重量に達するのに対し、72時間以降も回復は非常に緩徐で120時間でも正常に戻ることはなかった。Tp群では36~72時間までHx群に比べ有意に低値であったが、96時間で有意差がなくなり、120時間目に正常値に回復した。

実験4 部分肝切除後の残存肝血小板集積におよぼす抗凝固剤の影響 (図21)

今回、使用した抗凝固薬（ヘパリン、アスピリン、OKY-046、メシル酸ナファモスタット）では、部分肝切除後の肝組織中5HT集積を抑制することはできなかった。Nt群 ($1.27 \pm 0.13 \text{ nmol/g}$) に比べ、肝切4時間後の肝組織中5HT濃度は各群（Hp群 $2.02 \pm 0.29 \text{ nmol/g}$ 、Asp群 $1.95 \pm 0.037 \text{ nmol/g}$ 、Oky群 $1.87 \pm 0.27 \text{ nmol/g}$ 、Mn群 $1.90 \pm 0.21 \text{ nmol/g}$ ）とも有意に上昇し、Hx群 ($2.27 \pm 0.034 \text{ nmol/g}$) に対しては有意差を認めなかった。

【考察】

肝再生において、再生因子としてhepatocyte growth factor (HGF)¹⁰⁾、Epidermal growth factor (EGF)¹¹⁾、Transforming growth factor- α (TGF- α)¹²⁾などの液性因子の他、関与する細胞性因子として、クッパー細胞¹³⁾、星細胞¹⁴⁾の活性化が、よく知られている。しかし、血小板は多種の増殖因子を含むにもかかわらず、肝再生との関与についてはほとんど報告されていない。我々は部分肝切除後、残存肝へ血小板が集積する現象を初めて発見し、その意義について明らかにした。本研究において、抗血小板抗体を用いた免疫蛍光染色で、肝切除後4時間という早期に肝組織にび漫性の血小板集積を同定した。これに対し、Sham手術のマウス肝では、このような血小板の発色はほとんど無いことから、肝切除後、蛍光染色で認められた血小板は、単に血管内を流れる血小板ではなく、肝切除によって何らかの影響を受け、肝組織内に停留したものと推測される。

肝内への血小板集積は、これまでEndo²⁾、Pearsonら¹⁵⁾の報告があるが、いずれもLPS投与モデルによるものである。前者はマウスにおいて、血小板のマーカーとして5HTを測定したもので、後者はラット血小板を体外に取り出し、 Ci^{111} で標識して血管内にもどした後、肝組織への集積を見たものである。我々は、免疫染色の病理所見と、血小板集積の生化学的定量が相関するかを検討するため、肝組織中の5HT濃度の推移を検討し、その結果、肝組織中5HT濃度も術後4時間で最高値に達し、以後は漸減していたことから、免疫染色の所見と一致していることが明らかとなった。また、血中の血小板数と5HT濃度の経時的推移が、ほぼ同様であったことから、この5HT濃度測定法⁵⁾が体内の血小板動態を鋭敏かつ簡便に測定できる手法であることが明らかとなった。

血小板はどのような機序で、肝類洞に集積するのであろうか。今回の検討で、クッパー細胞を除去することで、蛍光免疫染色における血小板の発色が著しく低下し、また、肝内5HT濃度の上昇も抑制されることから、クッパー細胞が肝切除後の血小板集積に深く関与していることが明らかとなった。Nakamura、Endo³⁾は、LPSの他にも、血小板集積を惹起

する物質について、検討を行っており、IL-1 β とTNF- α によっても同様の肝内5HT濃度の上昇（血小板集積）が起こることを、明らかにした。肝切除時のIL-1 β のmRNAの発現は、非常に早期におこる¹⁶⁾。また、クッパー細胞はLPS刺激で、直ちにTNF- α を産生することが知られている¹⁷⁾。したがって、肝切除によって残存肝のクッパー細胞が活性化し、これらのサイトカインを分泌することによって、類洞内に血小板を集積させている可能性が示唆された。しかし、部分肝切除後には、どのようにしてクッパー細胞が活性化するのか、という点は未だ不明である。Sham手術群では5HT上昇が起こらないことから、単純に手術侵襲が活性化の引き金となっているとは考えにくい。あるいは肝切除後に門脈圧の上昇やクッパー細胞全体数の減少で、腸管内からのエンドトキシンクリアランスが低下することにより、正常時よりも血中エンドトキシンが高くなり、クッパー細胞が刺激されるとも推測されるが、今回の検討では肝切後のクッパー細胞活性化の機序については解明できなかった。

血小板には種々の増殖因子が含まれているにもかかわらず、現在までは肝再生との関与についての報告は少ない。血小板に含まれる主な増殖因子として、HGF¹⁸⁾、EGF¹⁹⁾、Transforming growth factor- β (TGF- β)²⁰⁾、Platelet derived growth factor(PDGF)などがある。HGFは初代培養肝細胞で、そのDNA合成を強く促進し¹⁰⁾、EGFもインスリンとの相互作用で、やはり同細胞のDNA合成促進作用を持つ¹¹⁾。TGF- β はむしろ、DNA合成抑制作用が指摘されている²¹⁾が、培養胎児肝細胞においてはアルブミンmRNAの発現を促した²²⁾との報告もあることから、肝実質細胞の成熟や機能発現に関与している可能性がある。PDGFは星細胞の強力な活性化物質²³⁾で、コラーゲン産生促進作用を持っている²⁴⁾。また、5HTがEGFの作用を増強するという報告もある²⁵⁾。これらの増殖因子を含む血小板は、肝再生過程において、どのような働きを持っているのだろうか。今回の電顕所見を詳細に観察すると、非常に興味深い血小板の動態が認められた。それは、貯蔵顆粒を保持したままの血小板がディッセ腔に入りこんで、肝実質細胞へあた

かも“触手”を伸ばし、接触しているような所見があったことである。これはNakamura、Endoら³⁾もLPS投与後の肝で確認している所見であり、彼らはさらに、肝実質細胞内にも血小板構造を認め、やがて血小板が肝細胞内に取り込まれる所見をも報告している。これまで、前述の増殖因子はparacrineあるいはautocrine的に肝再生に作用するとされてきたが、血小板が肝実質細胞内に取り込まれるということは、これらの因子が、直接、肝細胞の細胞質内に供給されるということを示唆している。増殖因子は現在のところ、細胞表面のレセプターを介した細胞内シグナル伝達により機能を発現すると考えられているが、細胞質内に直接、供給されることがあるとすれば、レセプターを介した場合と異なる作用を持つ可能性も考えられる。そこで我々は、血小板が肝再生において、これまで知られていない機能を担っているのではないかと考え、検討を行った。まずはじめに、生食投与群とクッパー細胞除去群での肝再生を比較してみた。クッパー細胞除去群では、PCNA陽性率の最高値まで達する時間が、生食投与群36時間に対し、48時間と遅延しているうえ、最高値も有意差をもって低値であった。その結果、再生肝体重比は術後48時間以降で、有意差をもって回復が遅れており、72時間以降も肝体重比の上昇が見られず、正常値に戻ることはなかった。以上の結果より、クッパー細胞除去によって血小板集積を抑制した場合、肝再生が遅延することが明らかとなった。しかし、これはクッパー細胞を消去した状況下での肝再生であって、肝への血小板集積が抑制されてはいるが、血小板の機能を特異的に抑えたわけではない。そこで我々は、血小板機能をより詳細に解析するため、抗血小板抗体投与による血小板減少マウスを作製し、検討を行った。その結果、血小板減少群はクッパー細胞除去群と同様、肝再生が遅れ、再生肝体重比は36～72時間で生食投与群(Hx群)より有意に低値となった。血小板集積を抑制した場合も、血小板自体を減少させた場合も、肝再生が遅延することから、血小板はクッパー細胞を介して類洞に集積し、肝再生に促進的に作用していると考えられる。血小板減少状態での肝再生実験は、Kuwashimaら²⁶⁾がirradiation thrombocytopenic ratで肝切を行ったという報告がある。彼らは、血小板減少群と正常群で³H-thymidine labeling indexの最高値に有意差はない

と報告したが、最高値に達する時間は、我々と同様、遅延していた。今回の我々の検討において、血小板集積が肝切除後4時間と非常に早く最高値に達し以後は漸減していくという結果が得られたことも考え合わせると、血小板は肝再生のごく初期のinitiationに関与しており、血小板の集積が減少あるいは抑制されると肝再生の初期課程に遅れが生じるものと考えられる。今回の抗血小板抗体単回投与での検討では、血小板減少状態は投与後3日間程度しか維持できず、以後急激に血小板数は回復するので、抗体を連続投与し、血小板数減少状態を維持すれば、さらに肝再生が遅れる可能性がある。また、現在は不可能であるが、血小板がロックアウトされたモデル動物ができれば、血小板集積の意義について、より確かにできると考えられる。

電顕における類洞内での血小板の形態は、血液凝固時とは異なり、血小板に脱顆粒像はなく、フィブリン沈着や類洞内皮の傷害も認めなかった。これら所見から、我々は肝切除後の血小板集積は凝固作用によるものではないと考えた。血液凝固に関する集積ならば、抗凝固薬によって血小板集積が抑制できることになるが、ヘパリン、アスピリン、TXA₂合成阻害薬OKY-046、プロテアーゼ阻害薬メシル酸ナファモスタット等の投与では、肝5HT濃度の上昇は抑制できなかった。LPS投与肝傷害モデルにおいては、LPSが1mg/kgBWを越える量での検討が多く、この場合、血小板が類洞内凝固に関係し、肝病態を進行させると報告されている²⁷⁾。また、抗凝固薬が病態軽減に有効だったという報告も見られる²⁸⁾。しかし、Endoら²⁹⁾は、0.1~10 μ g/kgBWと少量のLPS投与でも血小板の肝内集積が惹起され、この場合は類洞でのフィブリン沈着や血小板の脱顆粒を認めず、さらに抗凝固剤を投与しても肝への5HT（血小板）の集積は抑制できなかったことを報告している。彼らは、少量LPS投与時の血小板集積は大量投与の場合とは異なる可能性を指摘しており、こうした所見は我々の実験結果と非常に類似している。肝障害時の血小板凝集誘発物質として、トロンボキサンA₂（TXA₂）³⁰⁾や血小板活性化因子（PAF）³¹⁾が報告されており、これらは、いずれも肝切除時にも血中濃度が上昇する^{32), 33)}が、今回の検討では、TXA₂合成阻害薬OKY-046を投与した場合でも5HT濃度上昇が抑制できなかったことが

ら、TXA₂の関与は否定的である。また、PAFについては、Nakamura、Endo³⁾がPAFアンタゴニストのWEB2170で、やはり5HT濃度上昇の抑制ができなかったことを報告している。肝切除後のPAF発現の経時的推移は、今回我々が検討した肝内5HT濃度の推移より遅延している³³⁾ことから、やはり血小板集積の起因物質とは考えにくい。したがって、肝切除後と肝傷害時の血小板集積では、血小板が集められる機序も血小板自体の持つ作用も、大きく異なっているということが示唆された。

以上、本実験では、マウスの70%部分肝切除モデルにおいて、術後早期に残存肝への血小板集積を認め、クッパー細胞を除去することによって、肝切除後の肝内血小板集積は抑制された。クッパー細胞を除去して肝内血小板集積を抑制した場合、あるいは血小板を減少させた場合、いずれも肝再生はコントロールよりも遅延した。また、抗凝固薬は、部分肝切除後の肝内血小板集積を抑制することはできないということが確認された。電顕所見ではディッセ腔から直接肝細胞に接触するような所見も認められるので、血小板はcell to cell contactで何らかの機能を発揮していると推測された。局所で血小板が肝実質細胞にどのような作用をするのか、また血小板中のどの因子がどのように肝再生の進行に働くのかという点は、今後の課題である。

【結論】

部分肝切除マウスにおいては、術後早期に肝類洞への血小板集積が惹起され、この血小板集積はクーパー細胞を介して生じる現象であることが確認された。血小板集積が抑制された状態では、肝再生が遅延することも確認され、肝切時早期に肝に集積してくる血小板は肝再生課程に重要な役割を持っていると考えられた。しかし、肝切後、血小板が類洞局所ではどのように働いているかという点は、今後さらに検討が必要である。

参照文献

- 1) Endo Y. (1983) A lipopolysaccharide and concanavalin A induce variations of serotonin levels in mouse tissues. *Eur. J. Pharmac.*, **91**, 493-9.
- 2) Endo Y., Nakamura M. (1992) The effect of lipopolysaccharide, interleukin-1 and tumour necrosis factor on the hepatic accumulation of 5-hydroxytryptamine and platelets in the mouse. *Br. J. Pharmac.*, **105**, 613-9.
- 3) Nakamura M., Shibasaki M., Nitta Y., Endo Y. (1998) Translocation of platelets into Disse spaces and their entry into hepatocytes in response to lipopolysaccharides, interleukin-1 and tumour necrosis factor: the role of Kupffer cells. *J. Hepatol.*, **28**, 991-9.
- 4) Nakamura T. (1987) Growth regulation and regeneration mechanism of the mature hepatocyte. *Exp. Med.*, **5**, 107-12 (in Japanese).
- 5) Tadano T., Endo Y., Kisara K. (1980) A simple determination of serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid and 5-hydroxytryptophan decarboxylase activity in rat brain areas and parallel correlation among the levels. *Jap J Pharmac.*, **30**, 347-56.
- 6) Nagata Y., Shozaki Y., Nagahisa H., Nagasawa T., Abe T., Todokoro K. (1997) Serum thrombopoietin level is not regulated by transcription but by the total counts of both megakaryocytes and platelets during thrombocytopenia and thrombocytosis. *Thromb. Haemost.*, **77**, 808-14.
- 7) Nagata Y., Nagahisa H., Aida Y., Okutomi K., Nagasawa T., Todokoro K. (1995) Thrombopoietin induces megakaryocyte differentiation in hematopoietic progenitor FDC-P2 cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19673-5.
- 8) Van Rooijen N. (1989) The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J. Immun. Methods*, **124**, 1-6.
- 9) Tschaikowsky K., Brain J. D. (1994) Effects of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate on macrophage function and endotoxin-induced mortality. *Biochim. Biophys. Acta*, **1222**, 323-30.
- 10) Nakamura T., Nawa K., Ichihara A. (1984) Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 1450-9.

- 11) Andreis P. G., Armato U. (1981) Effects of epidermal growth factor/urogastrone and associated pancreatic hormones on mitotic cycle phases and proliferation kinetics of neonatal rat hepatocytes in primary culture. *Endocrinology* , **108**, 1954-64
- 12) Webber E. M., Wu J. C., Wang L., Merlino G., Fausto N. (1994) Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **145**, 398-408.
- 13) Widmann J. J., Fahimi H. D. (1975) Proliferation of mononuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial cells in regenerating rat liver. *Am. J. Pathol.* **80**, 349-66.
- 14) Vrochides D., Papanikolaou V., Pertoft H., Antoniadis A. A., Heldin P. (1996) Biosynthesis and degradation of hyaluronan by nonparenchymal liver cells during liver regeneration. *Hepatology* , **23**, 1650-5.
- 15) Pearson J. M., Schultze A. E., Jean P. A., Roth, R. A. (1995) Platelet participation in liver injury from gram-negative bacterial lipopolysaccharide in the rat. *Shock*, **4**, 178-86.
- 16) Higashitsuji H., Arii S., Furutani M., Mise M., Monden K., Fujita S., Ishiguro S., et al. (1995) Expression of cytokine genes during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J. Surg. Res.*, **58**, 267-74.
- 17) Decker K. (1990) Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.*, **192**, 245-61.
- 18) Nakamura T., Teramoto H., Ichihara A. (1986) Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 6489-93.
- 19) Oka Y., Orth D. N. (1983) Human plasma epidermal growth factor/beta-urogastrone is associated with blood platelets. *J. Clin. Invest.* **72**, 249-59
- 20) Assoian R. K., Komoriya A., Meyers C. A., Miller D. M., Sporn M. B. (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* **258**, 7155-60.

- 21) Carr B. I., Hayashi I., Branum E. L., Moses H. L. (1986) Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type beta transforming growth factor. *Cancer Res.*, **46**, 2330-4.
- 22) Sanchez A., Alvarez A. M., Benito M., Fabregat I. (1995) Transforming growth factor beta modulates growth and differentiation of fetal hepatocytes in primary culture. *J. Cell. Physiol.*, **165**, 398-405.
- 23) Pinzani M., Gesualdo L., Sabbah G. M., Abboud H. E., (1989) Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J. Clin. Invest.* **84**, 1786-93.
- 24) Peterson T. C. (1993) Pentoxifylline prevents fibrosis in an animal model and inhibits platelet-derived growth factor-driven proliferation of fibroblasts. *Hepatology*, **17**, 486-93.
- 25) Balasubramanian S., Paulose C. S. (1998) Induction of DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes by serotonin: possible involvement of serotonin S2 receptor. *Hepatology*, **27**, 62-6.
- 26) Kuwashima Y., Aoki K., Kohyama K., Ishikawa T. (1990) Hepatocyte regeneration after partial hepatectomy occurs even under severely thrombocytopenic conditions in the rat. *Jap. J. Cancer Res.* **81**, 607-12
- 27) Hewett J. A., Roth, R. A. (1995) The coagulation system, but not circulating fibrinogen, contributes to liver injury in rats exposed to lipopolysaccharide from gram-negative bacteria. *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **272**, 53-62.
- 28) Asaka S., Shibayama Y., Nakata K. (1996) Pathogenesis of focal and random hepatocellular necrosis in endotoxemia: microscopic observation in vivo. *Liver*, **16**, 183-7
- 29) Endo Y., Nakamura M. (1993) Active translocation of platelets into sinusoidal and Disse spaces in the liver in response to lipopolysaccharides, interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Gen. Pharmac.*, **24**, 1039-53.
- 30) Bult H., Herman A. G., (1979) Thromboxane A2 biosynthesis during endotoxin-induced aggregation of platelets from normal and sensitized guinea-pigs. *Agent. Actions*, **9**, 560-5.

- 31) Komatsu Y., Shiratori Y., Hikiba Y., Hashimoto N., Han K., Kawase T., Yoshida H. et al. (1996) Role of platelet-activating factor in pathogenesis of galactosamine-lipopolysaccharide-induced liver injury. *Digest. Diseases. Sci.*, **41**, 1030-7.
- 32) Shimada M., Matsumata T., Taketomi A., Shirabe K., Yamamoto K., Sugimachi K. (1994) The role of prostaglandins in hepatic resection. *Prost. Leuk. Essen. Fat. Acids*, **50**, 65-8.
- 33) Lombard M. N., Izzo A. A., Benhaddi M., Natour J., Benveniste J. (1996) Liver and plasma concentrations in paf-acether and its precursors after partial hepatectomy. *Cell Prolif.* **29**, 33-41.

図表解説

図 1.

70%部分肝切除群 (Hx群) の肝切後24時間までの血中5HT濃度と血小板数の推移を平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。

図 2.

Sham手術群 (Sh群) 開腹後24時間までの血中5HT濃度と血小板数の推移を平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。

両群とも、血中5HT濃度と血小板数は経時的に同様の動態を示した。

図 3.

部分肝切除群 (Hx群) およびSham手術群 (Sh群) の肝切後24時間までの肝組織中5HT濃度の推移を平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。分散分析法で検定を行い、 $P<0.05$ で有意差があった場合、Scheffe F法で多重比較を行った。

図 4.

部分肝切除群 (Hx群) およびSham手術群 (Sh群) の抗血小板抗体を用いた免疫蛍光染色所見を示した。いずれも術後4時間の肝組織である。

図 5

部分肝切除後4時間の肝類洞の電顕病理所見である。

(×8000) : 矢印は類洞に集積する血小板を示した。*はディッセ腔である。EC (類洞内皮細胞) は正常形態が保たれている。

(×20000) : 矢印は類洞基底膜を越えて、ディッセ腔に入り込んだ血小板である。肝実

質細胞と接触している。

図6.

($\times 8000$) : 矢印は類洞に集積する血小板である。クッパー細胞 (KC) が著しい貪食像を呈している。

($\times 20000$) : クッパー細胞に囲まれた血小板が、ディッセ腔に入り、やはり肝実質細胞に接している。

図7.

生食投与群 (Hx群) およびクッパー細胞除去群 (Kd群) の肝切除直前のF4/80免疫染色所見を示した。それぞれ、Hx群は生食を、Kd群は Cl_2 MBP包埋リポソームを投与し、48時間後の肝組織である。

図8.

生食投与群 (Hx群) およびクッパー細胞除去群 (Kd群) 24時間までの血中5HT濃度と血中血小板数の推移を平均値 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) で示した。

参考値としてHx群の血中5HT濃度の平均値を破線で示した。

図9.

生食投与群 (Hx群) およびクッパー細胞除去群 (Kd群) の肝組織中5HT濃度の推移を平均値 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) で示した。

図10.

生食投与群 (Hx群) およびクッパー細胞除去群 (Kd群) の抗血小板抗体を用いた免疫蛍光染色所見を示した。弱拡 ($\times 50$)、強拡 ($\times 100$) のいずれも肝切除後4時間の肝組

織である。

図11.

抗血小板抗体Pm-1投与による作製した血小板減少群 (Tp群) における血算の推移を平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。これらのマウスは抗体を投与した後は、剖検まで無処置で経過観察した。

図12.

血小板減少群 (Tp群) の血清AST・ALT値の推移を平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。

図13.

血小板減少群 (Tp群) の血中血小板数と血中5HT濃度の推移を平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。

参考値としてHx群の血中5HT濃度の平均値を破線で示した。

図14.

生食投与群 (Hx群) および血小板減少群 (Tp群) について、部分肝切除後の肝組織中5HT濃度の24時間までの推移を平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。

図15.

生食投与群 (Hx群)、クッパー細胞除去群 (Kd群) および血小板減少群 (Tp群) の抗血小板抗体を用いた免疫蛍光染色所見を示した。弱拡 (×50)、強拡 (×100) のいずれも肝切除後4時間の肝組織である。

図16

生食投与群 (Hx群)、クッパー細胞除去群 (Kd群) および血小板減少群 (Tp群) について、肝切後120時間までの血清ALT値の推移を平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。

図17

生食投与群 (Hx群)、クッパー細胞除去群 (Kd群) および血小板減少群 (Tp群) における肝切後の残存肝のPCNA陽性率を24~96時間まで示した。平均値±標準偏差 (Mean±SD) で表記した。分散分析法で検定を行い、 $P<0.05$ で有意差があった場合、Scheffe F法で多重比較を行った。

図18

肝切後36時間の生食投与群 (Hx群)、クッパー細胞除去群 (Kd群) および血小板減少群 (Tp群) の抗PCNA免疫染色標本を示した。

図19

生食投与群 (Hx群) およびクッパー細胞除去群 (Kd群) の肝切後120時間までの再生肝体重比の推移を平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。分散分析法で検定を行い、 $P<0.05$ で有意差があった場合、Scheffe F法で多重比較を行った。

図20

生食投与群 (Hx群) および血小板減少群 (Tp群) の肝切後120時間までの再生肝体重比の推移を平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。分散分析法で検定を行い、 $P<0.05$ で有意差があった場合、Scheffe F法で多重比較を行った。

図21

術前に抗凝固薬を投与した後、肝切除を施行し、術後4時間時点での肝組織中5HT濃度を平均値±標準偏差 (Mean±SD) で示した。左からNt群 (無処置群)、Hx群 (術前生食投与)、Hp群 (ヘパリン200単位/kgBWを術前5分前投与)、Asp群 (アスピリン100mg/kgBWを術前1時間前投与)、Oky群 (トロンボキサンA2合成阻害薬OKY-046、50mg/kgBWを術前30分前投与)、Mn群 (プロテアーゼ阻害薬のメシル酸ナファモスタット5mg/kgBWを術前30分前投与) の順に表記した。Scheffeの分散分析法で多重比較を行い、 $P<0.05$ を有意差ありとした。

図1 血中5HT濃度と血小板数の推移 (実験1-1.)
(Hx群 : n=7)

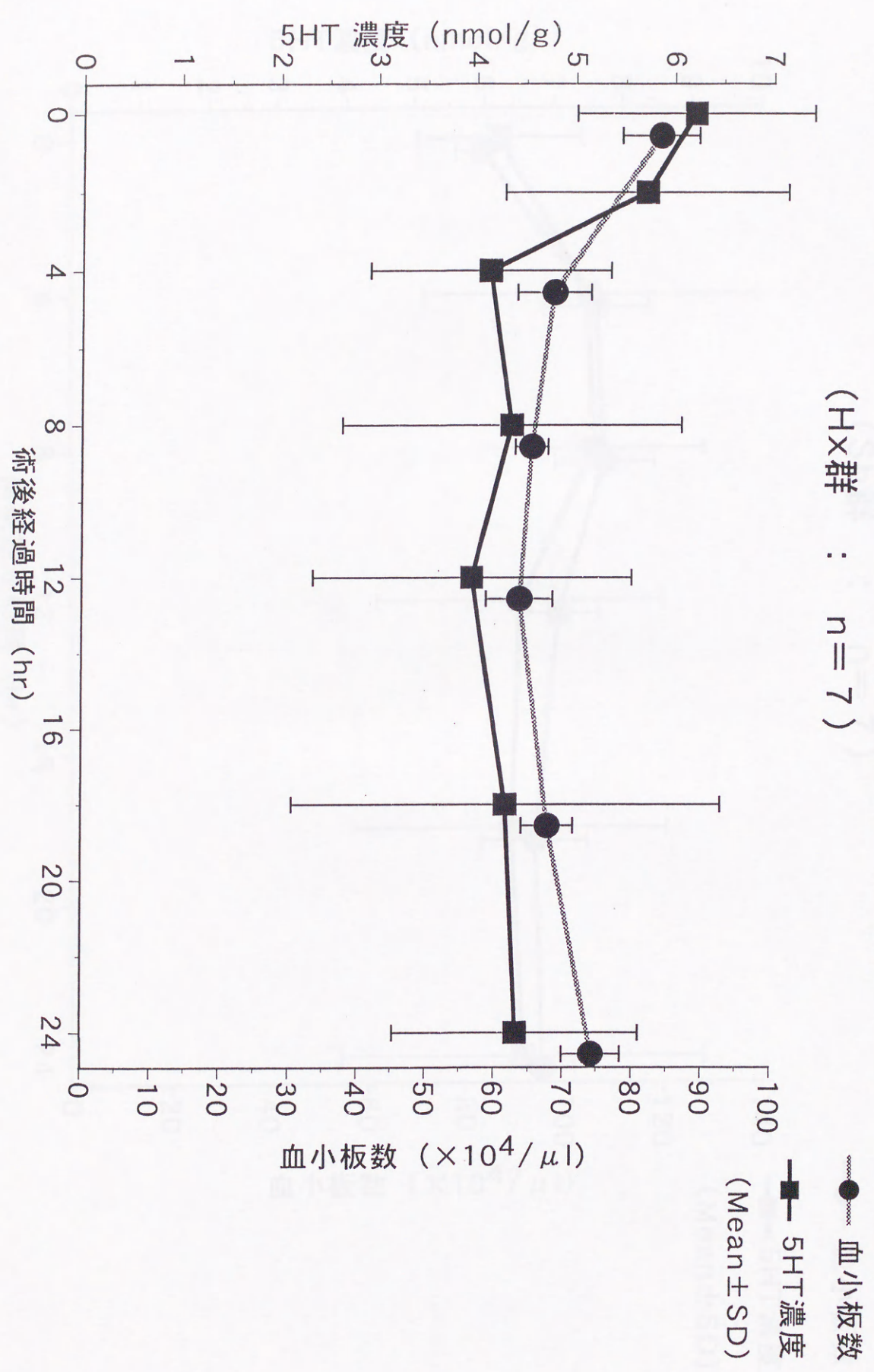


図2 血中5HT濃度と血小板数の推移 (実験1-1.)
(Sh群 : n = 7)

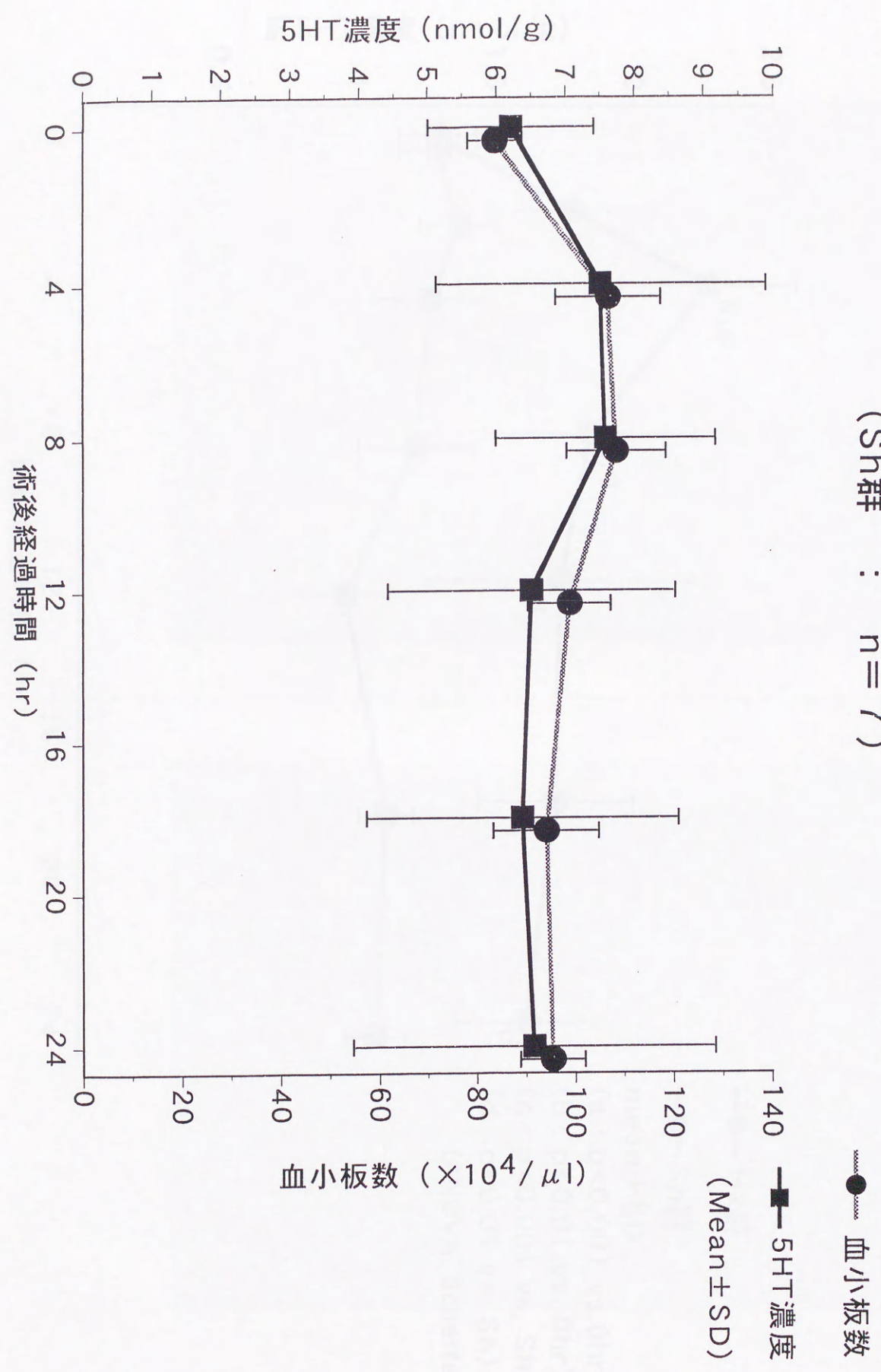


図3 70%部分肝切除マウスにおける
残存肝の組織内5-HT濃度の推移 (実験1-2.)

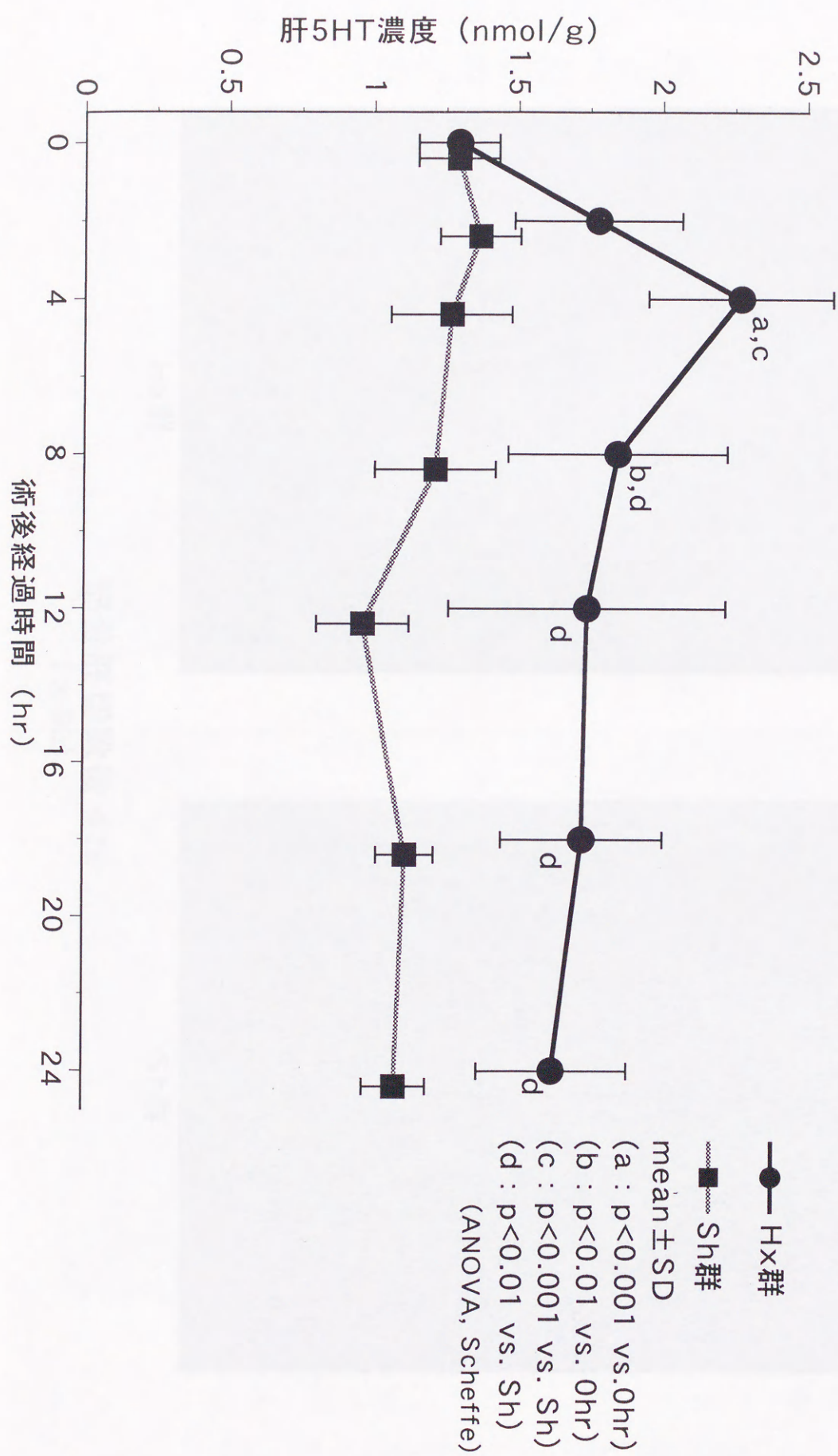
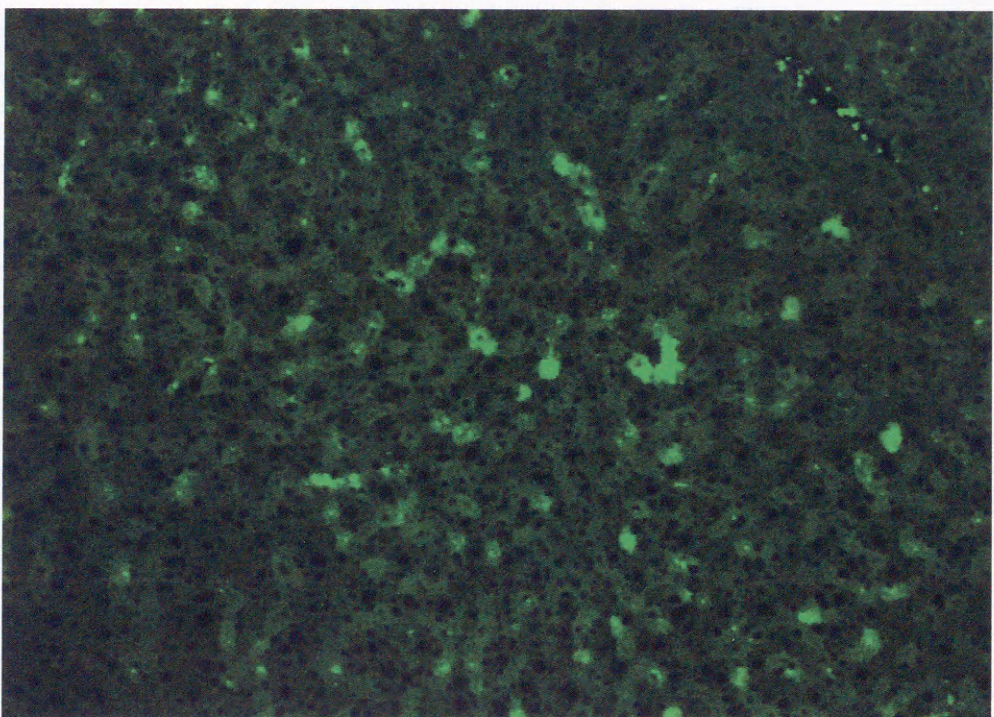
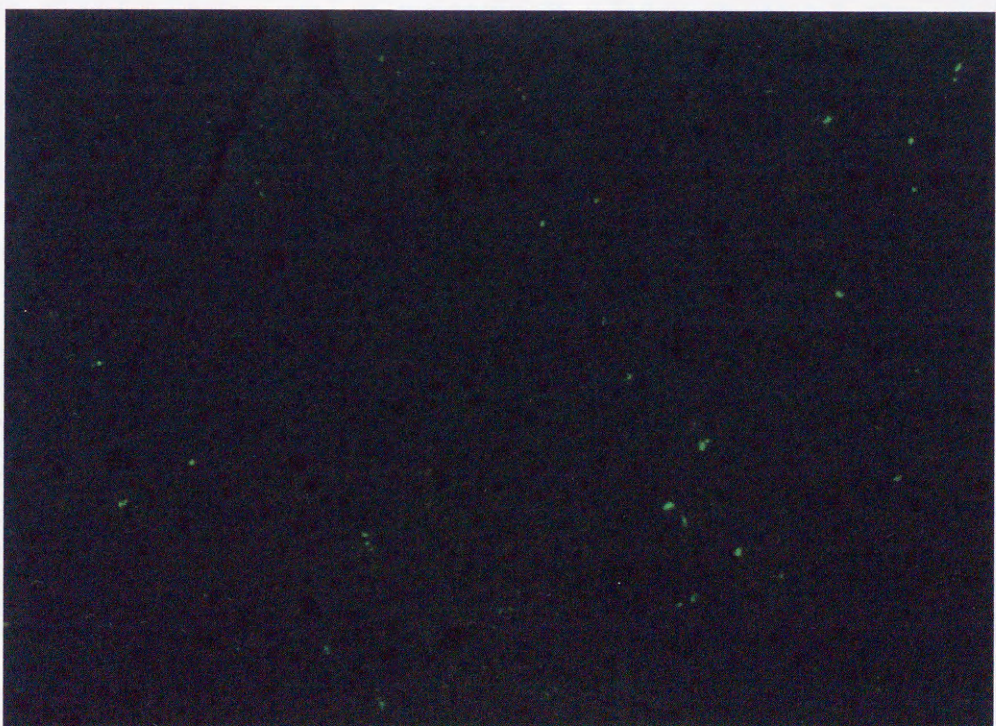


図4 抗血小板抗体P_m-1を用いた免疫蛍光染色 (実験1-3.)



Hx群

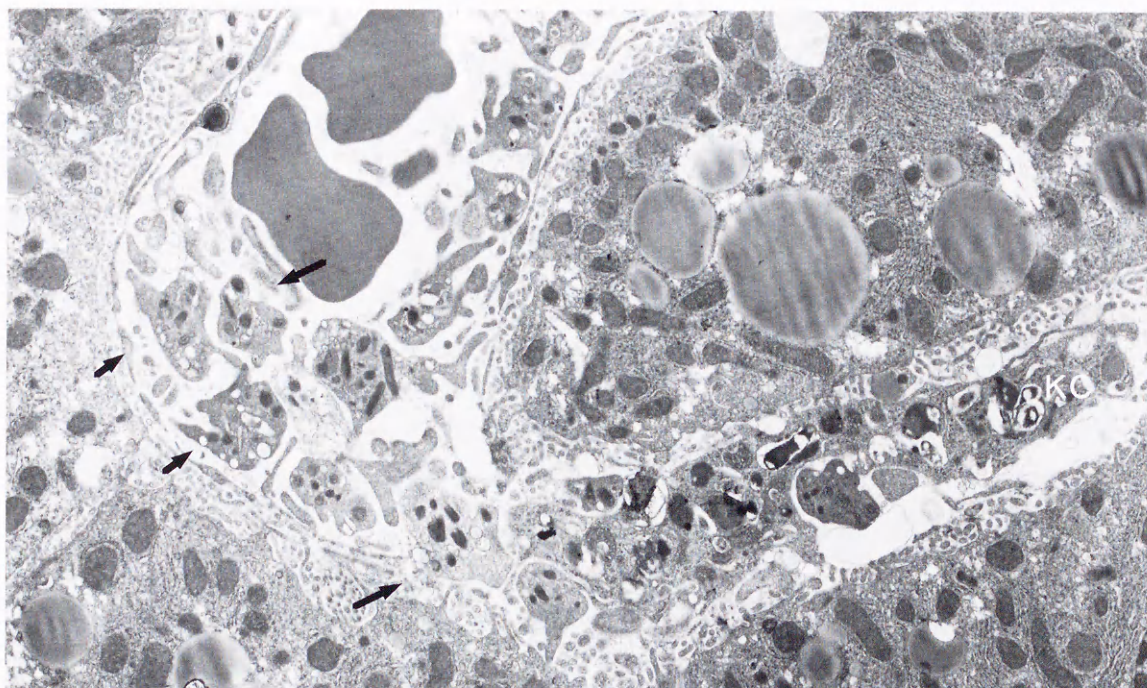


Sh群

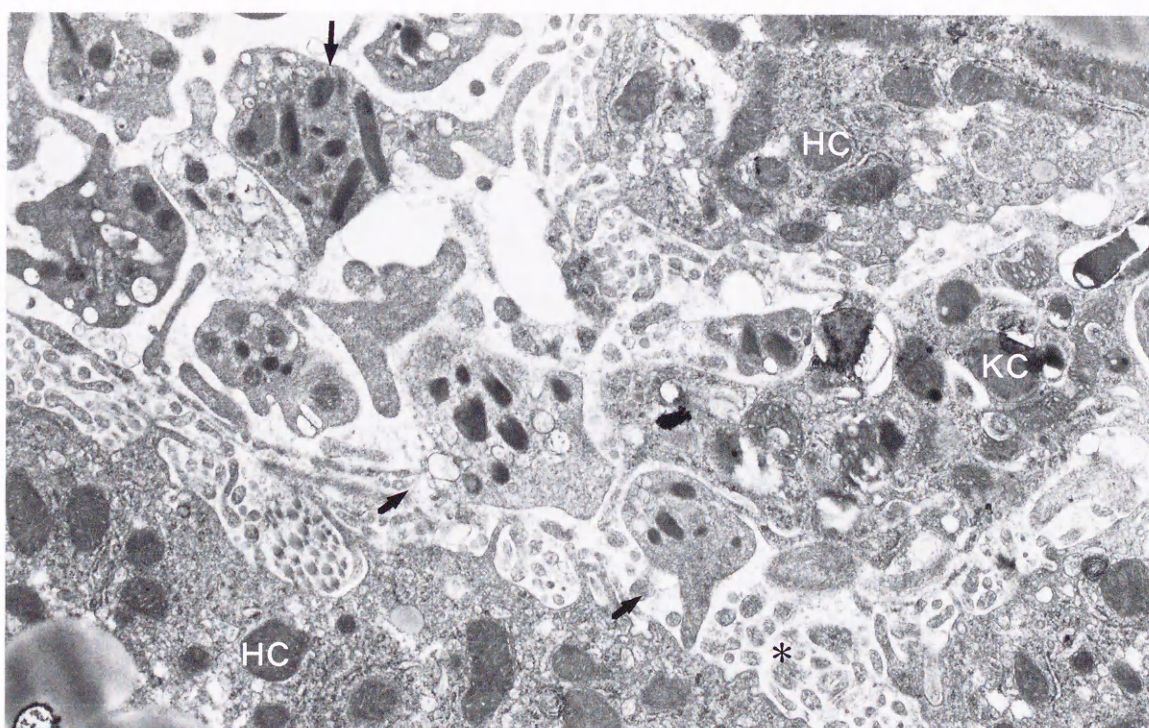
部分肝切除後 4 hr
(×50)

図 6 電顕組織所見（実験1-4.）

部分肝切除 4 hr後



(×8000)



(×20000)

➡：血小板

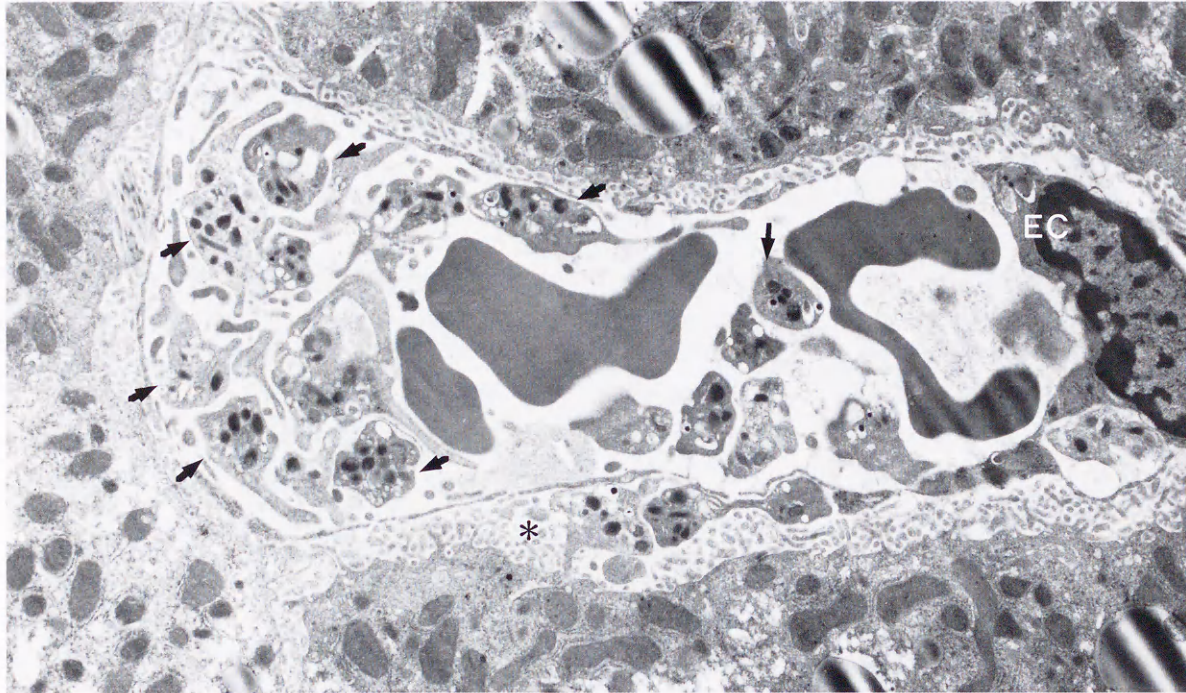
KC：クッパー細胞

*：ディッセ腔

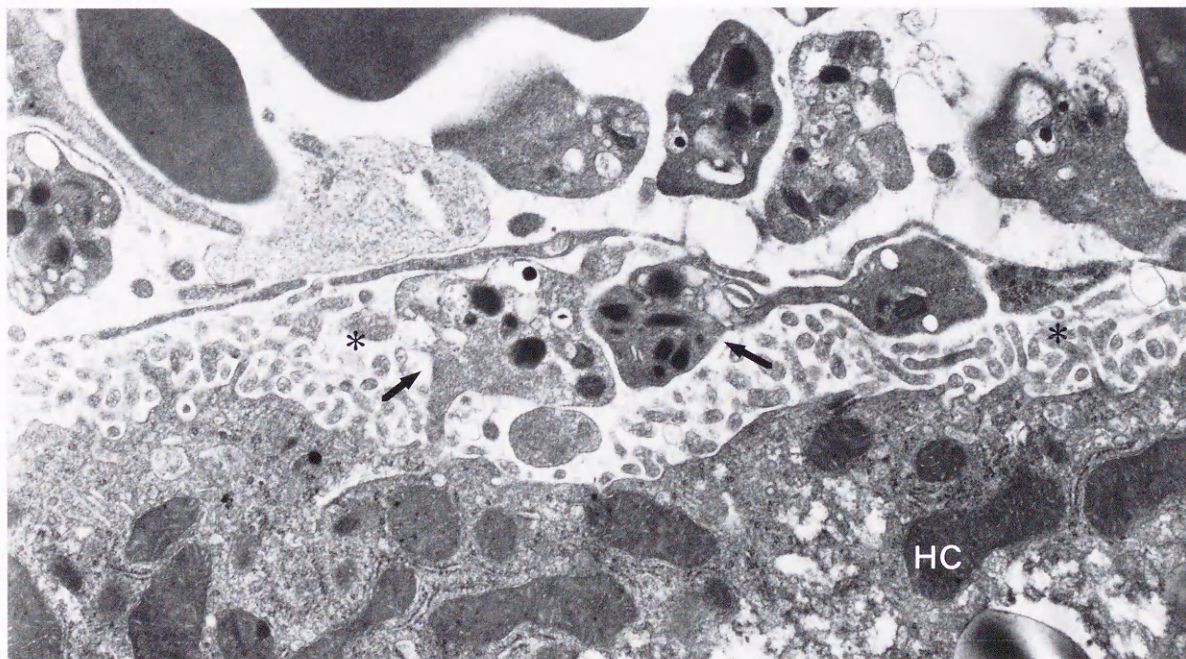
HC：肝細胞

図5 電顕組織所見（実験1-4.）

部分肝切除 4 hr後



(×8000)



(×20000)

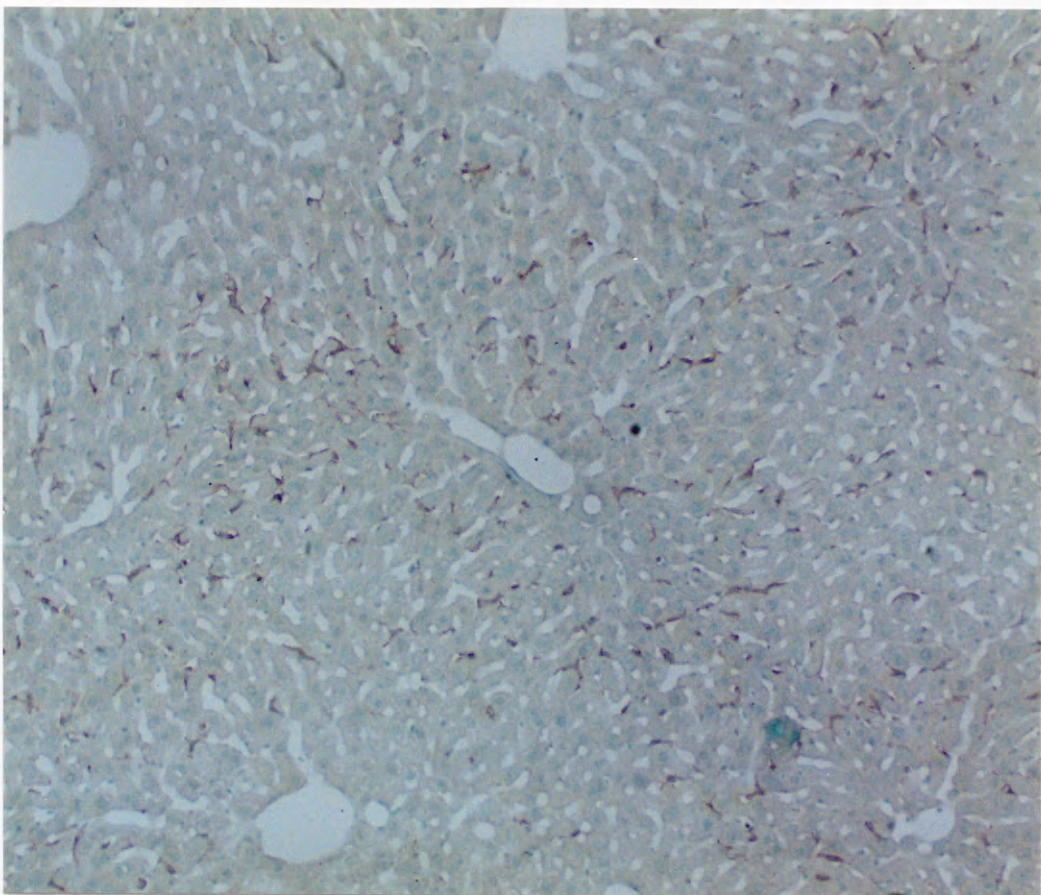
➡：血小板

HC：肝細胞

*：ディッセ腔

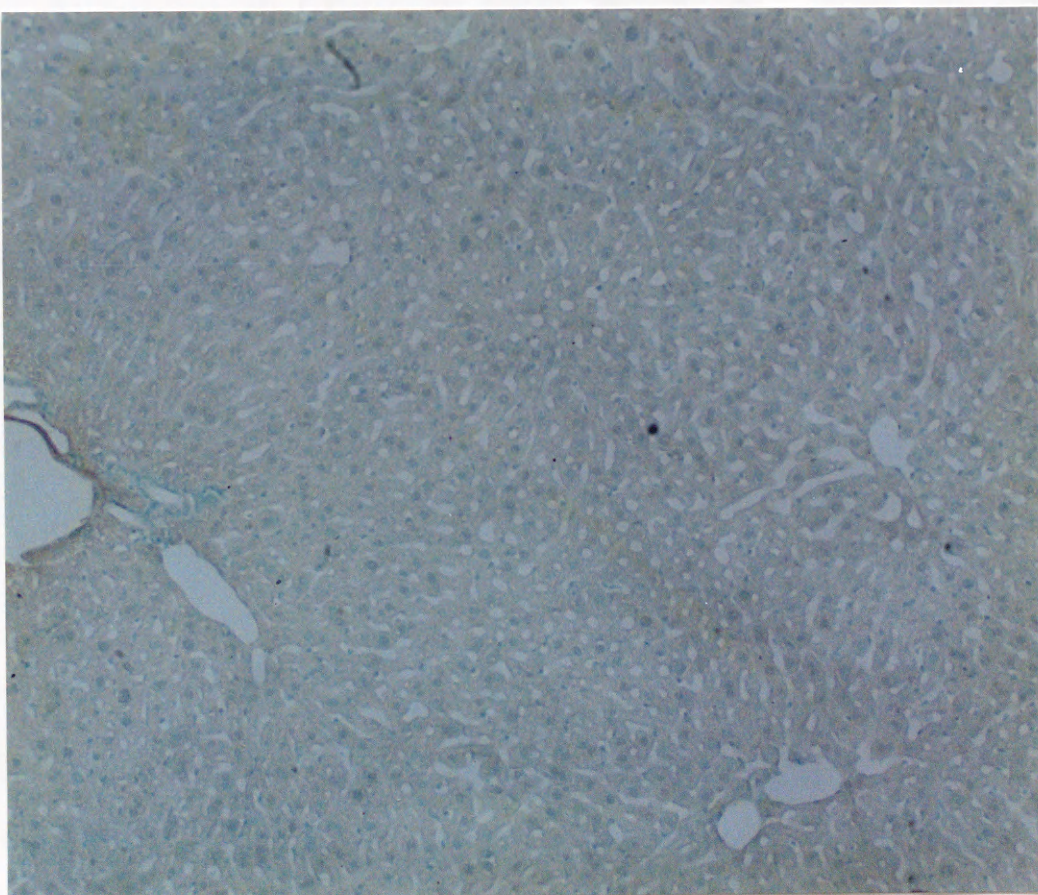
EC：類洞内皮細胞

図7 CL2MBP包埋リポソームによるクッパー細胞除去（実験2）
（F4/80免疫染色：×40）



Hx群

（生食投与後48時間）



Kd群

（リポソーム投与後48時間）

図8 クッパー細胞除去マウスにおける
血中5HT濃度と血小板数の推移 (実験2-1.)

(Kd群 : n=7)

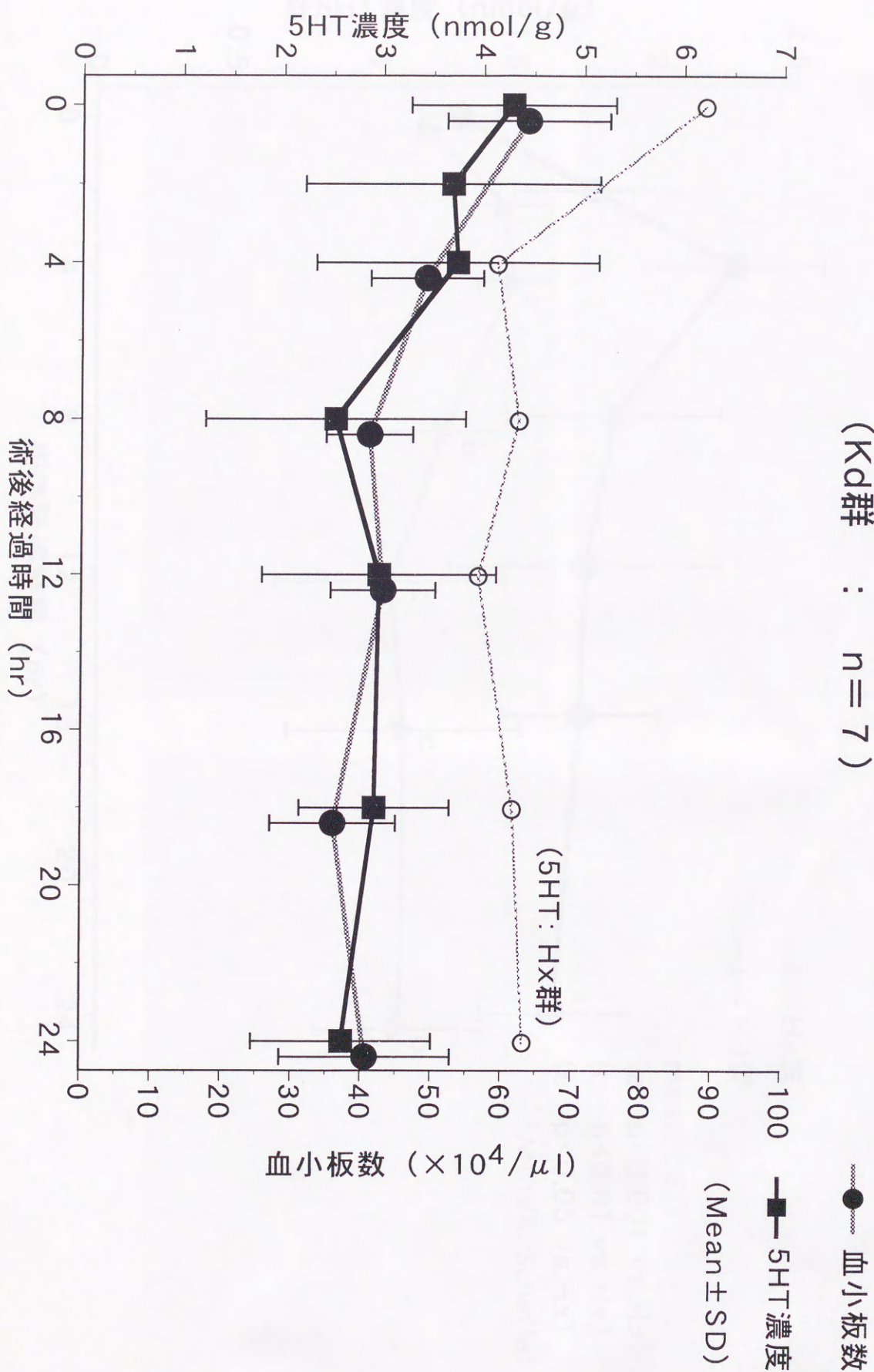


図 9 クッパー細胞除去マウスにおける
部分肝切除後の肝内5-HT濃度の推移 (実験2-2.)

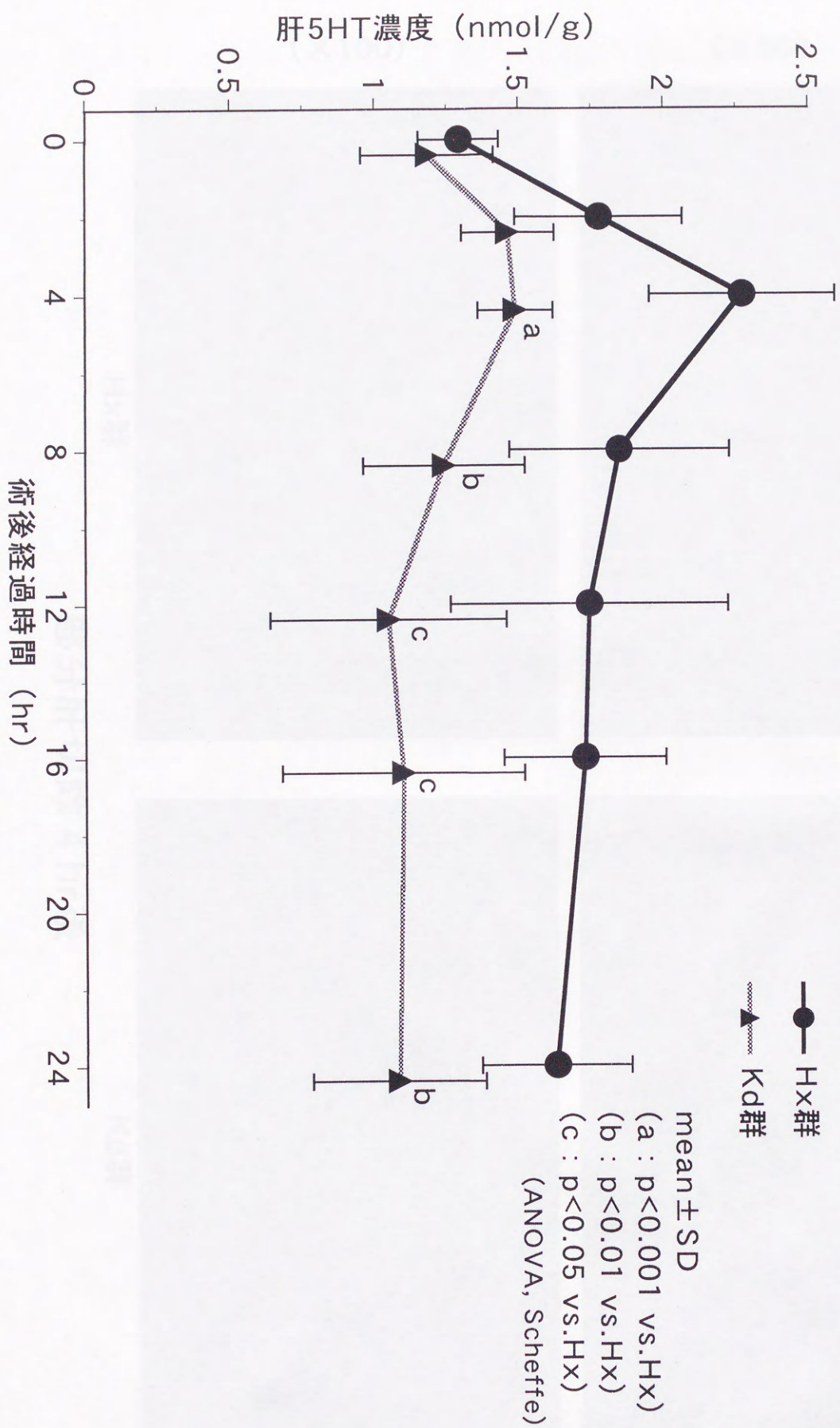


図10 抗血小板抗体による免疫蛍光染色 (実験2-3.)

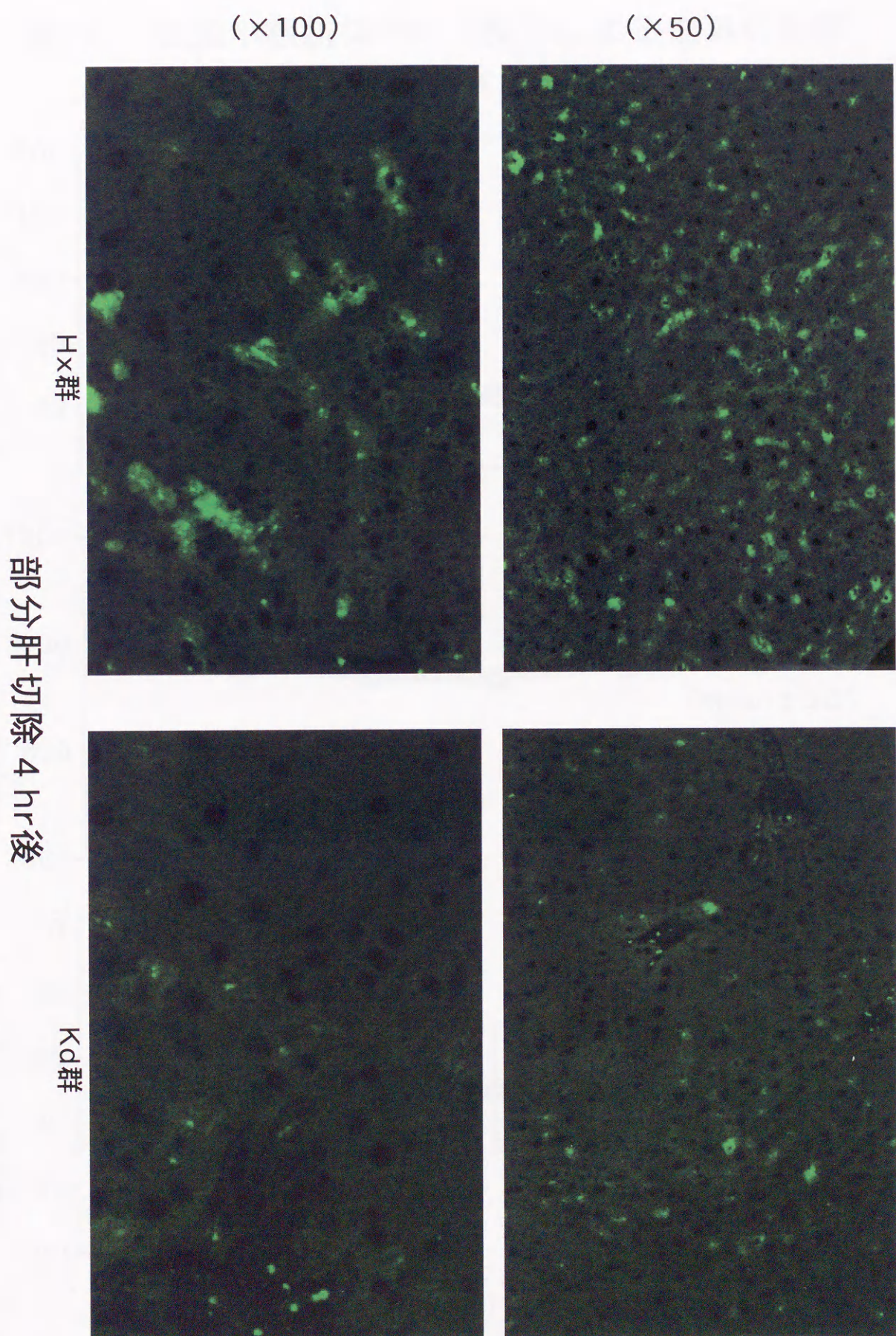


図11 抗血小板抗体Pm-1投与による血算の推移
(実験3、予備実験1-①)

(Pm-1 : 100 μ g/Body)

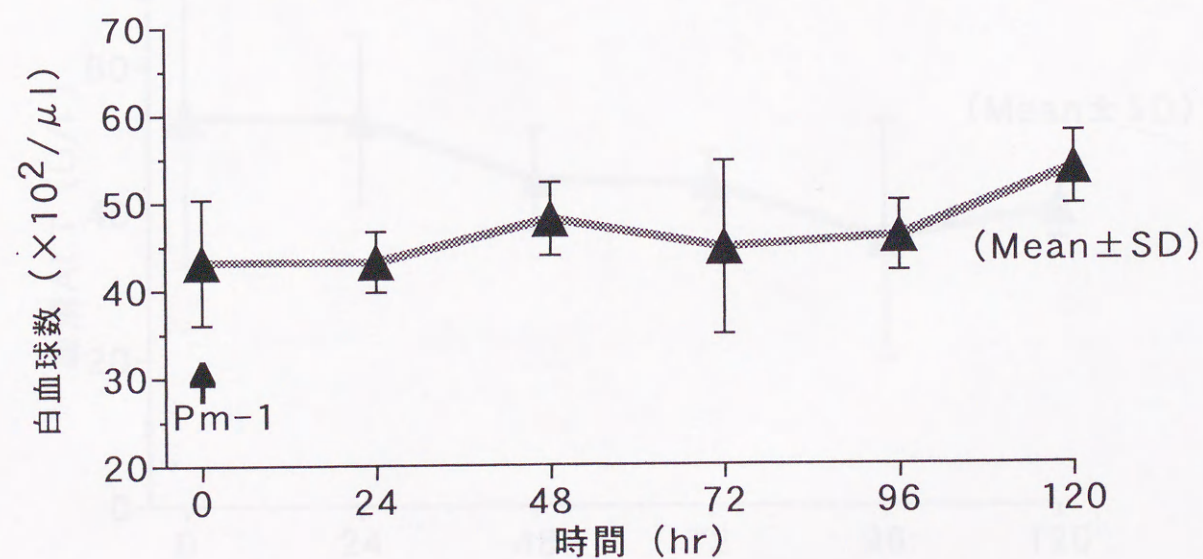
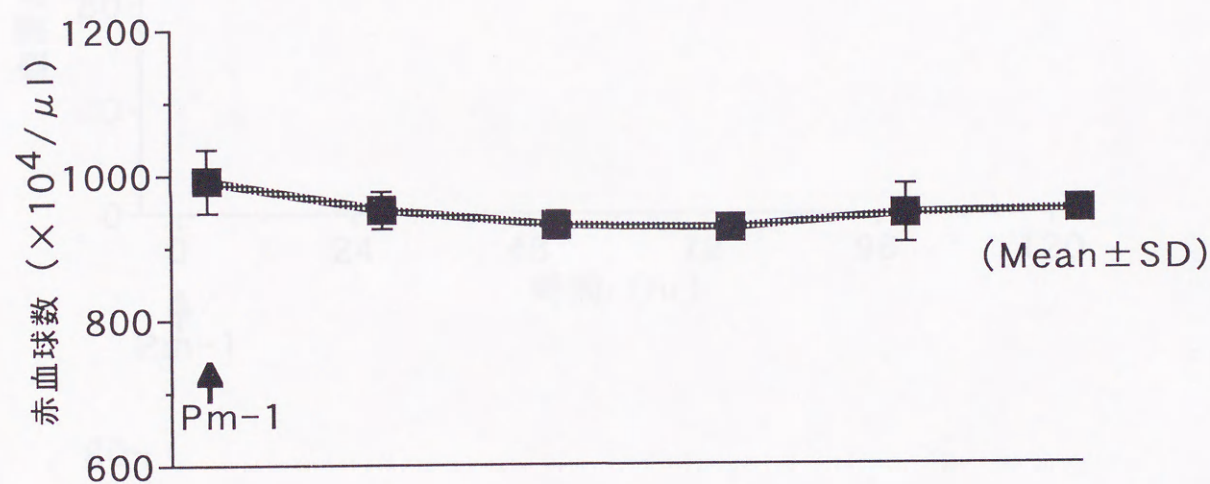
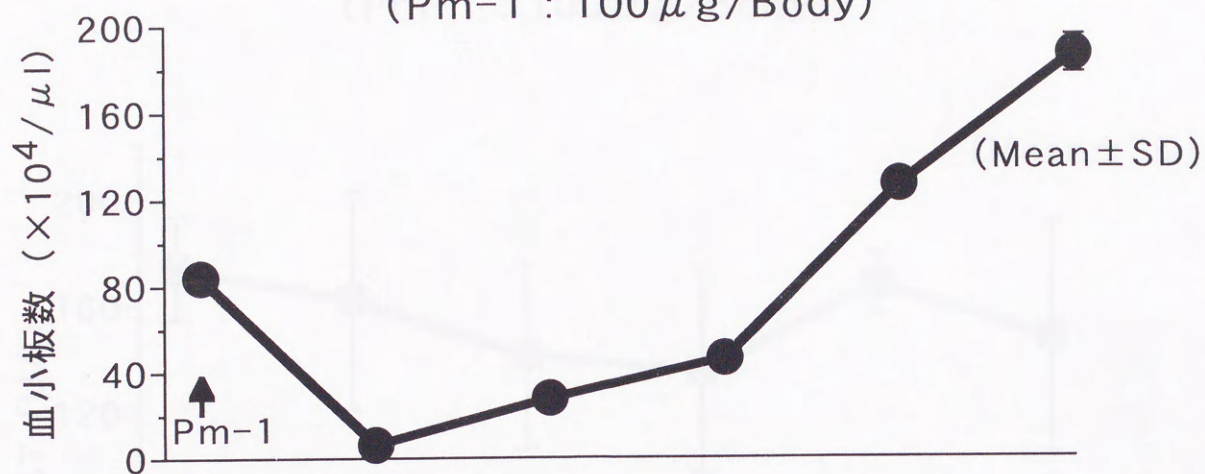


図12 抗血小板抗体Pm-1投与時の肝機能の推移
(実験3、予備実験1-②)
(Pm-1 : 100 μ g/Body)

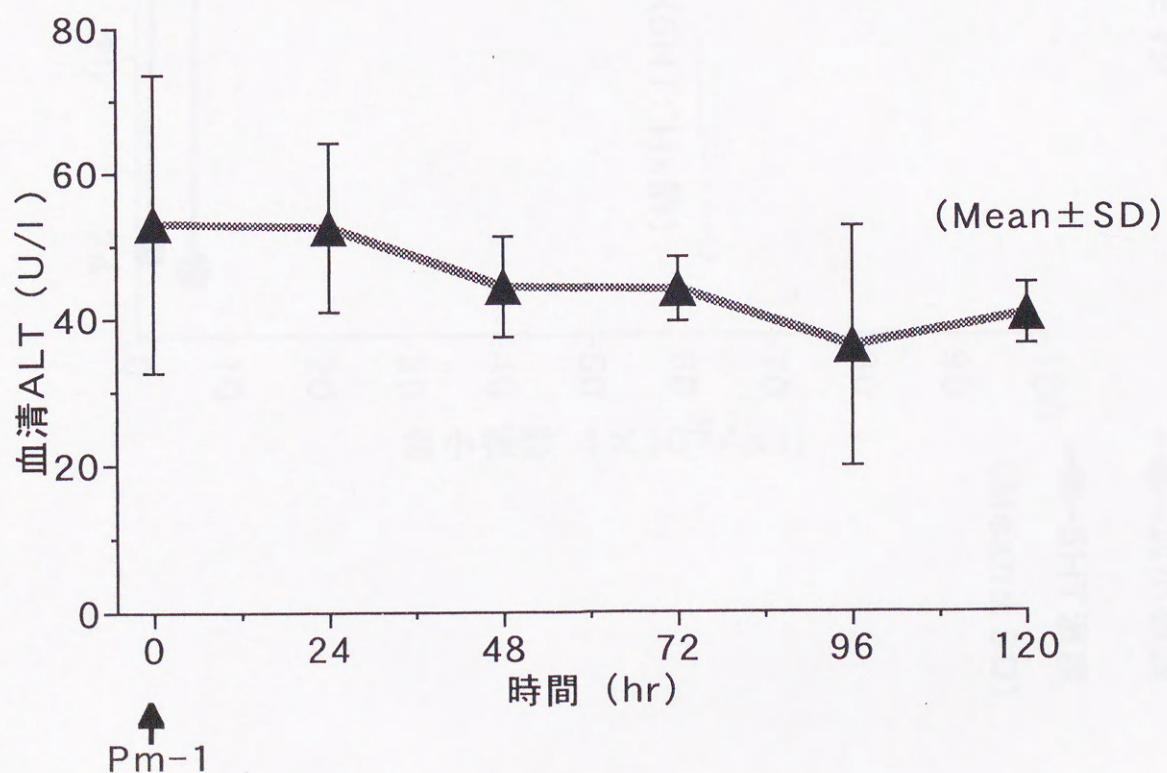
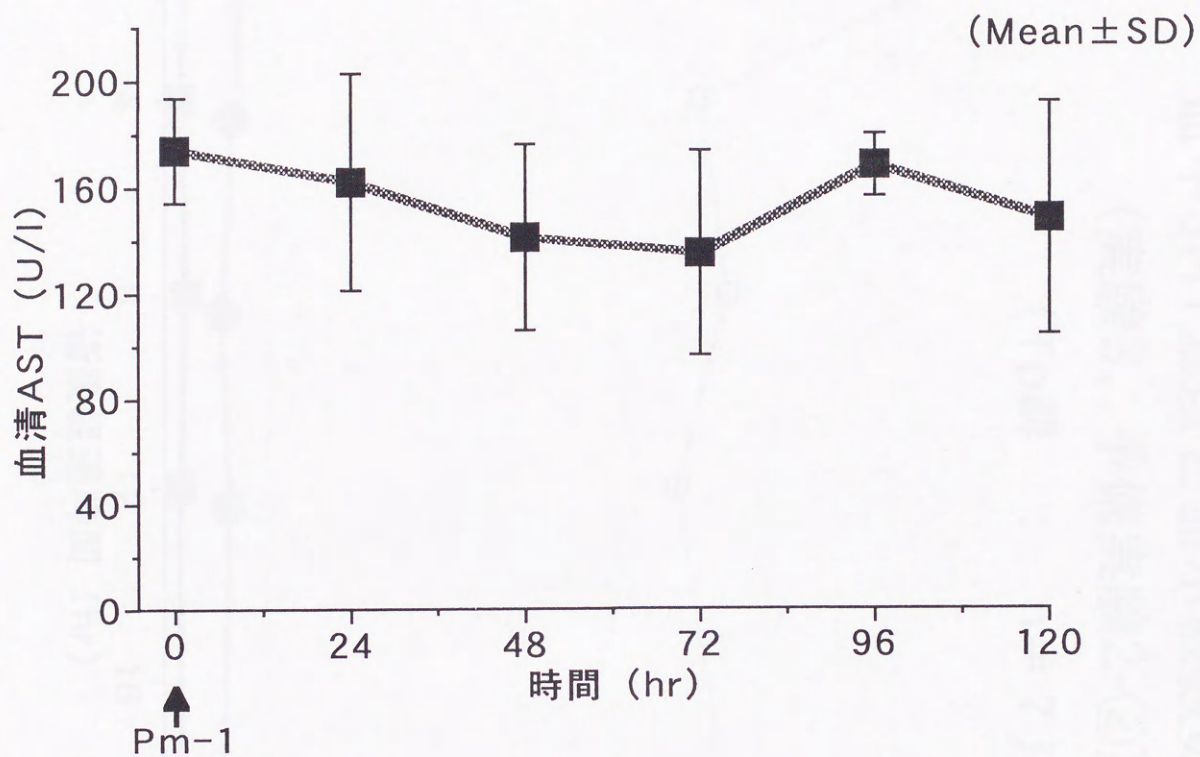


図13 血小板減少マウスにおける

血中5HT濃度と血小板数の推移

(実験3、予備実験2-②)

(Tp群 : n = 7)

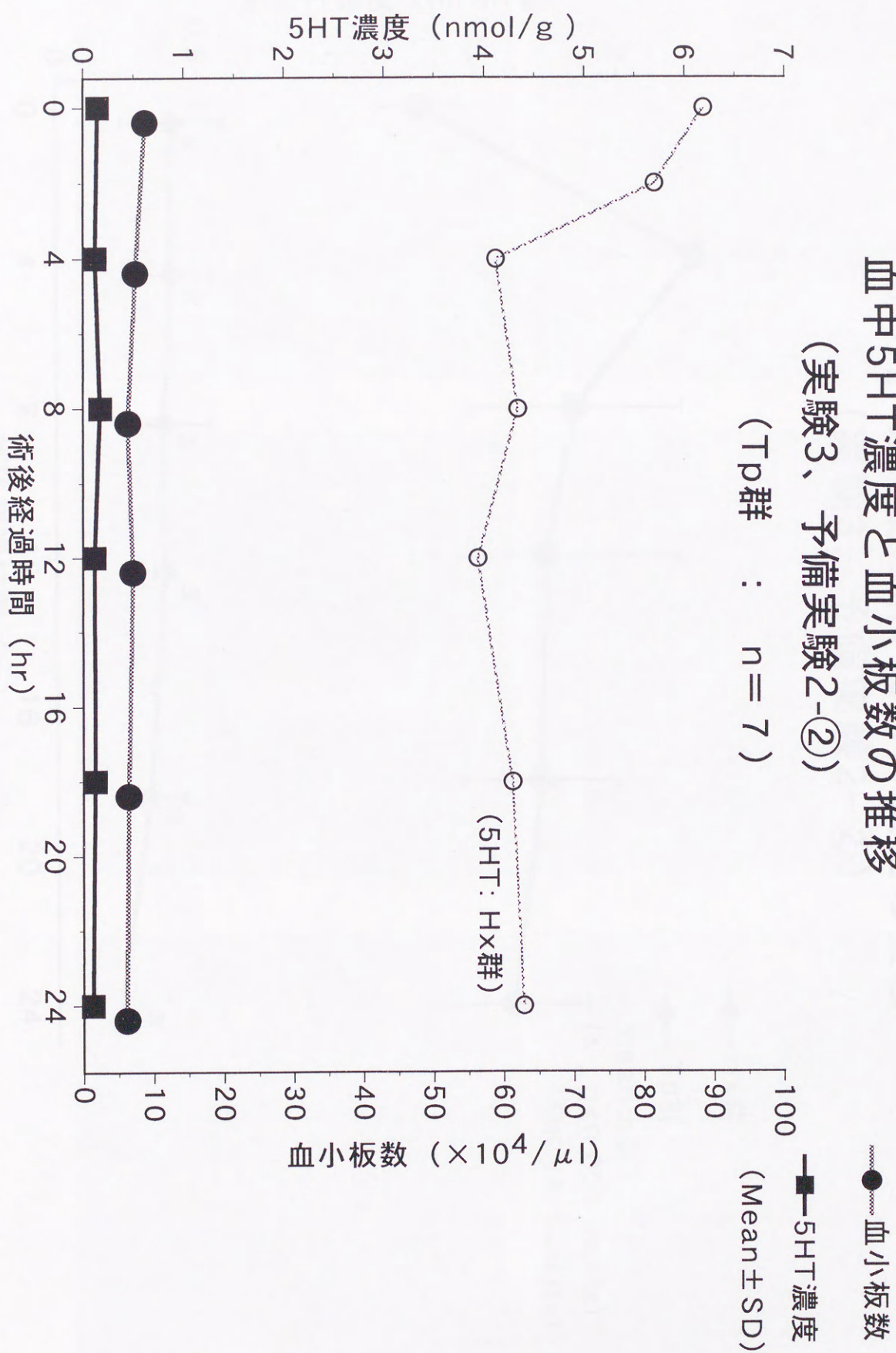


図14 血小板減少マウスにおける
部分肝切除後の肝内5-HT濃度の推移
(実験3、予備実験2-②)

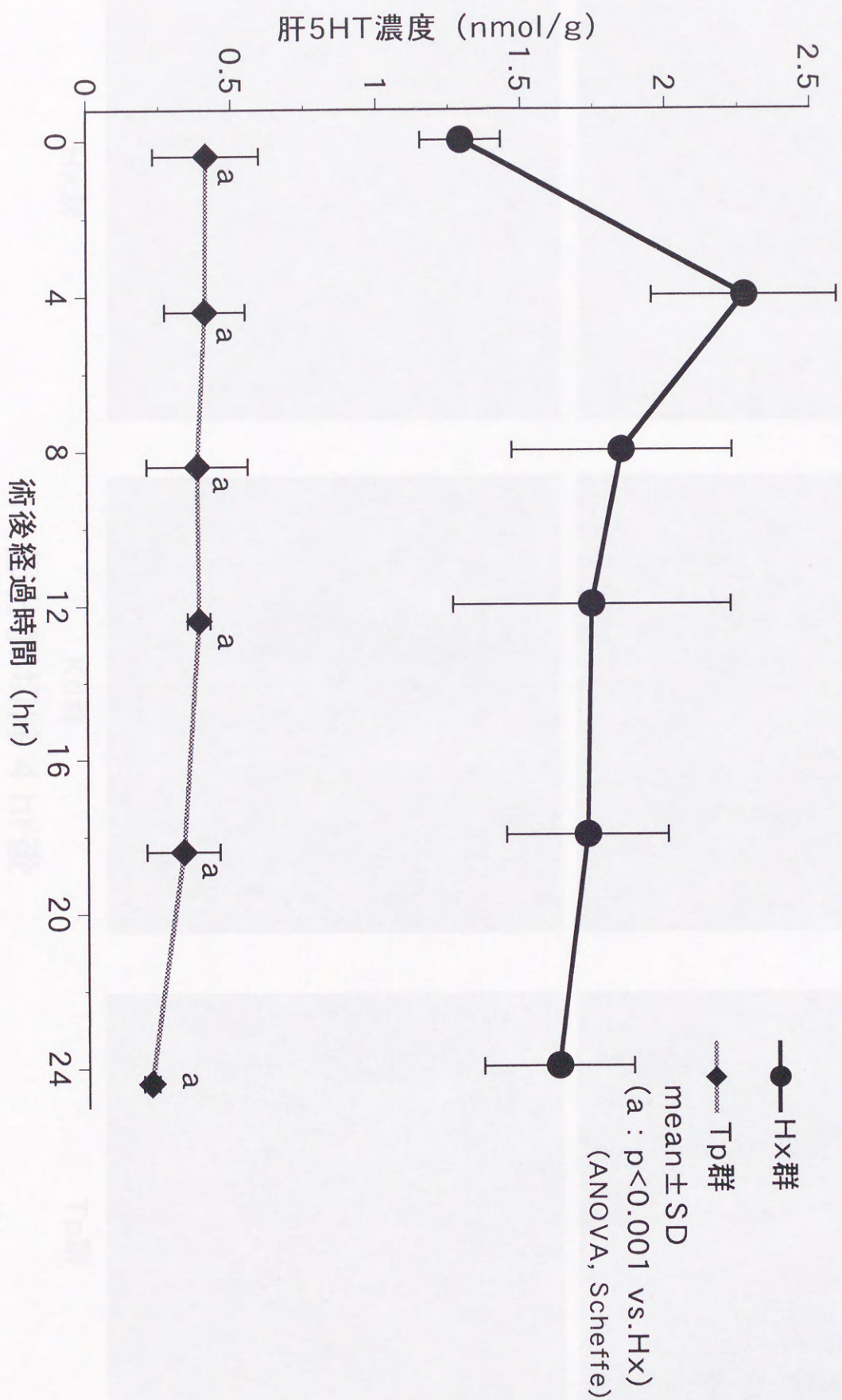
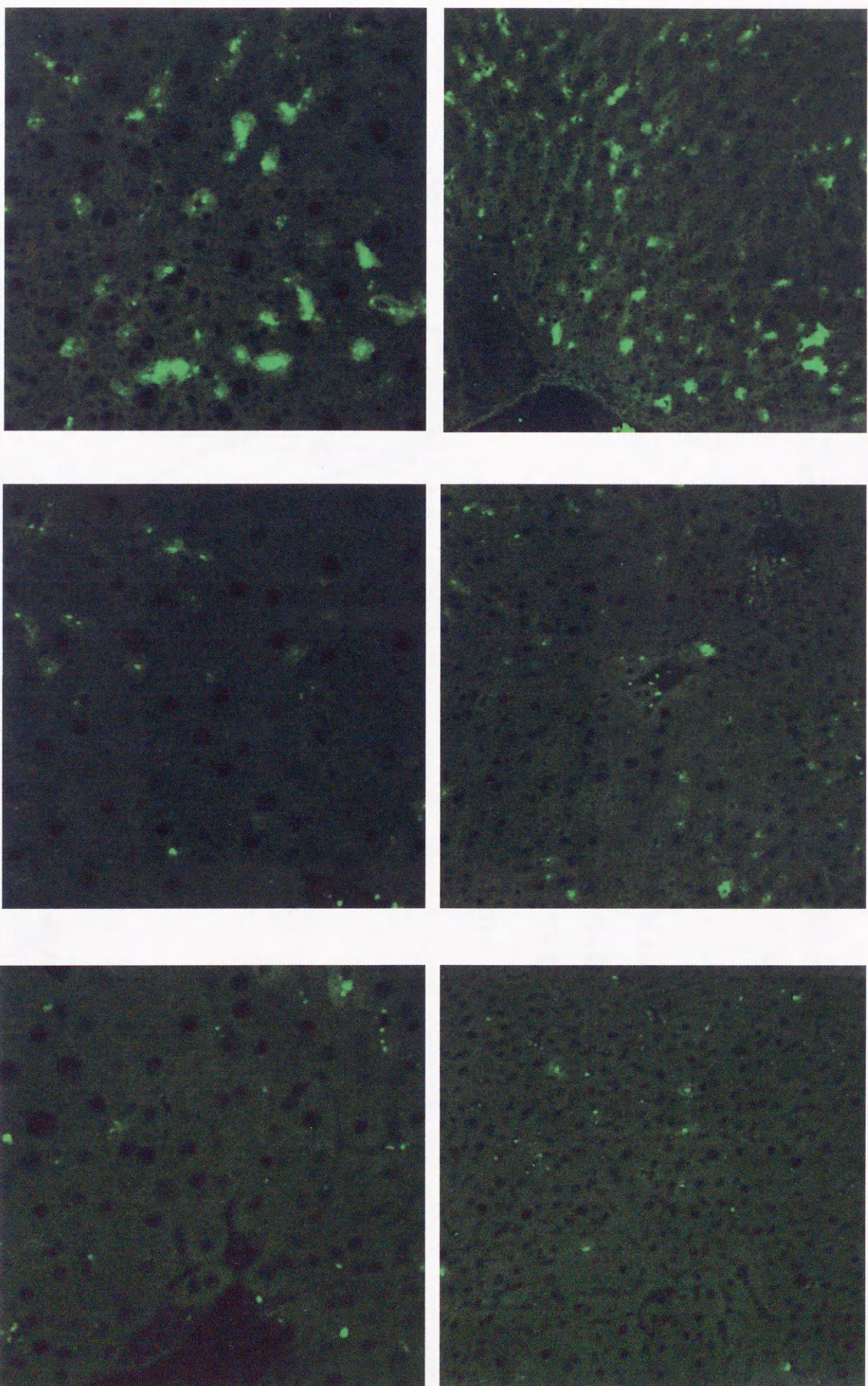


図15 抗血小板抗体による免疫蛍光染色 (実験3, 予備実験2-③)



Hx群

Kd群

Tp群

部分肝切除 4 hr後

図16 血清ALT値の推移 (実験3-1.)

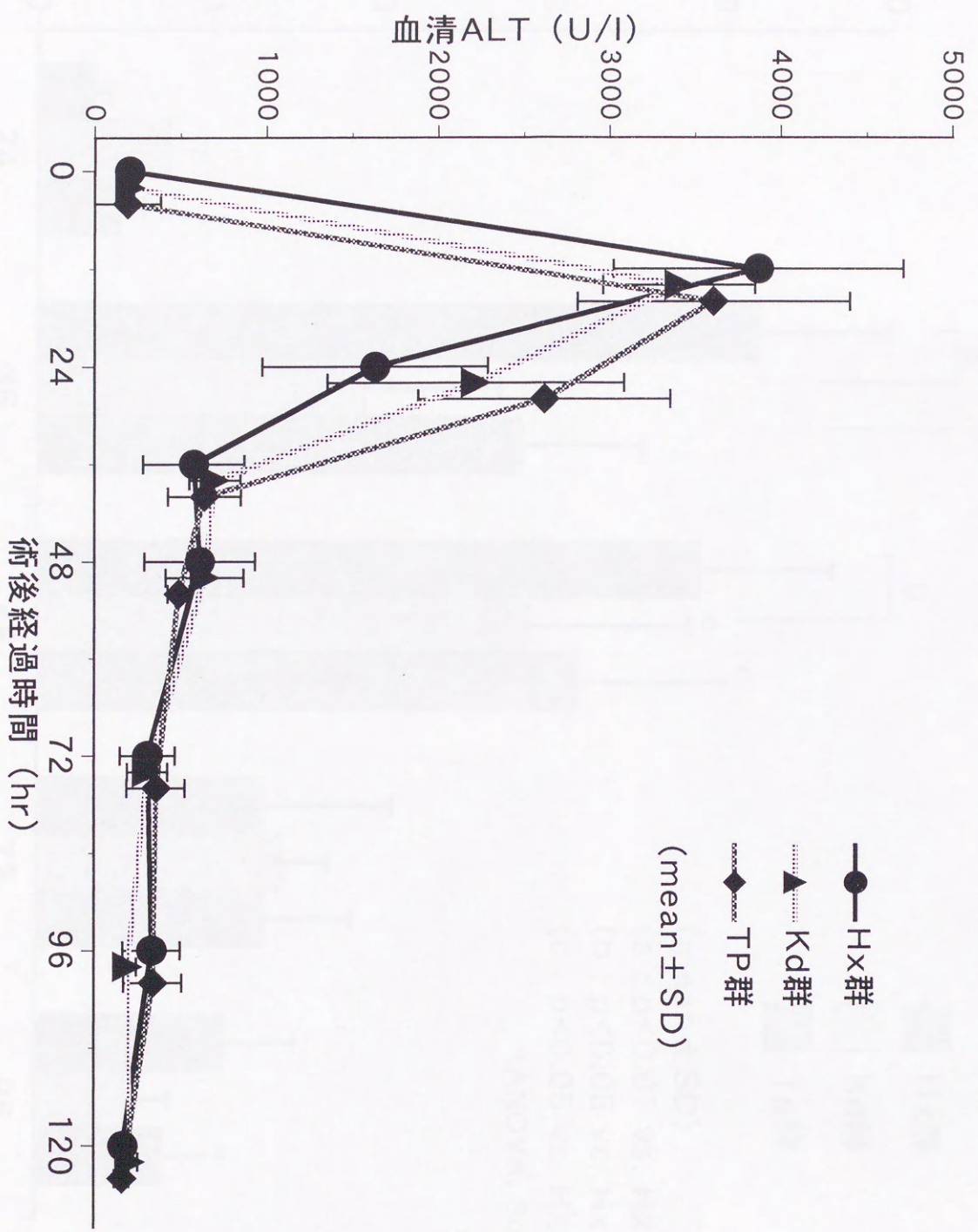


図17 残存肝のPCNA陽性率の推移 (実験3-2.)

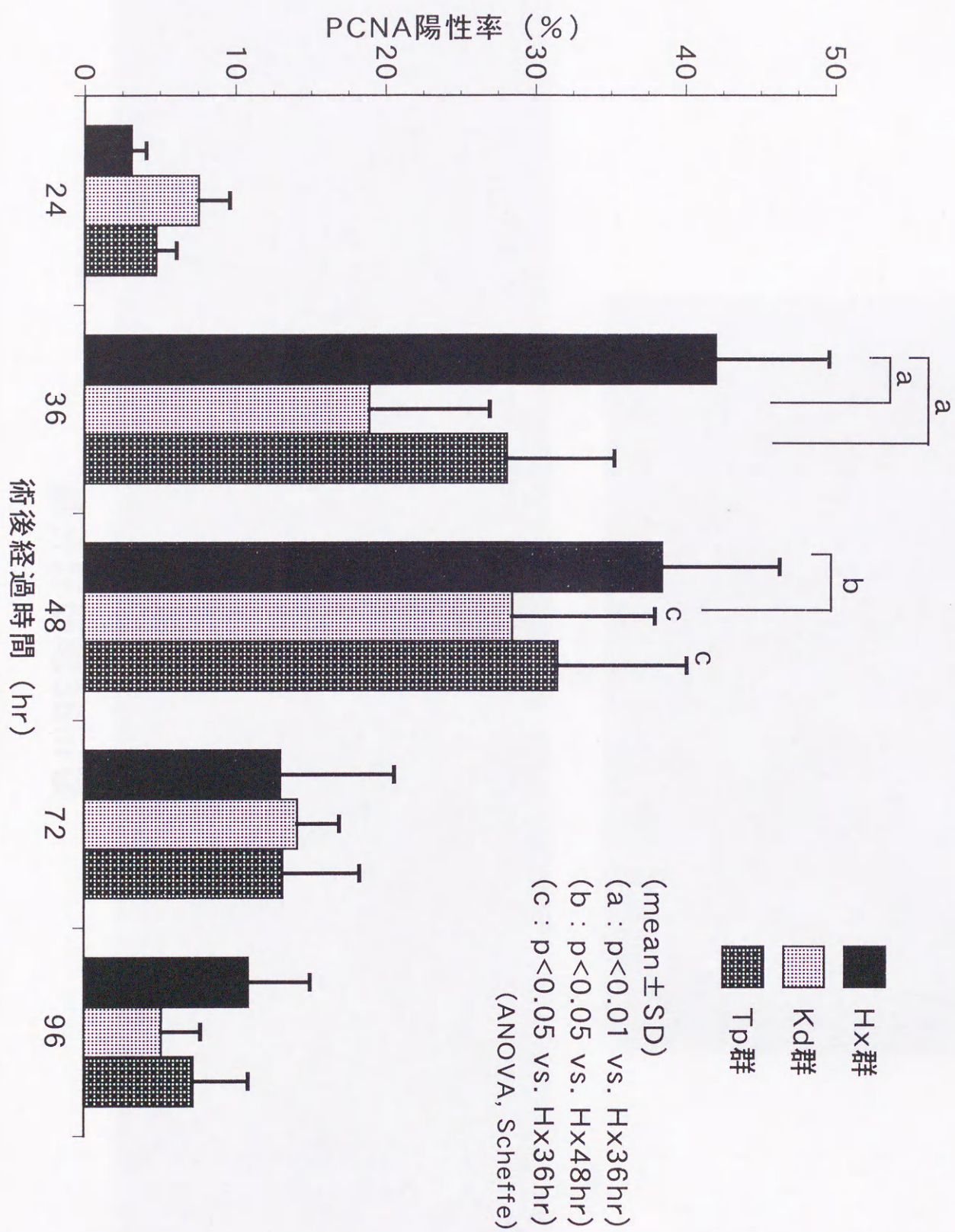
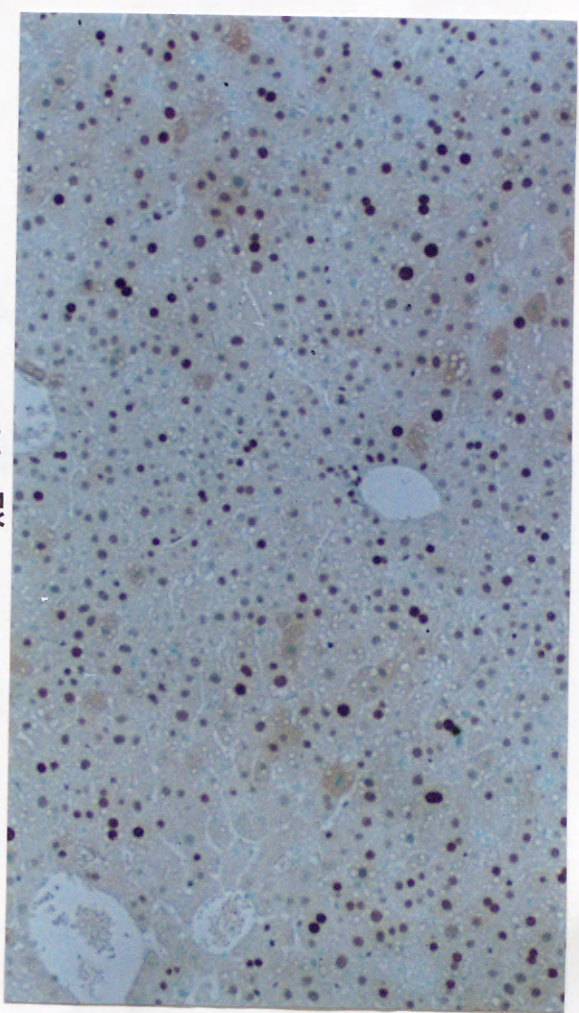
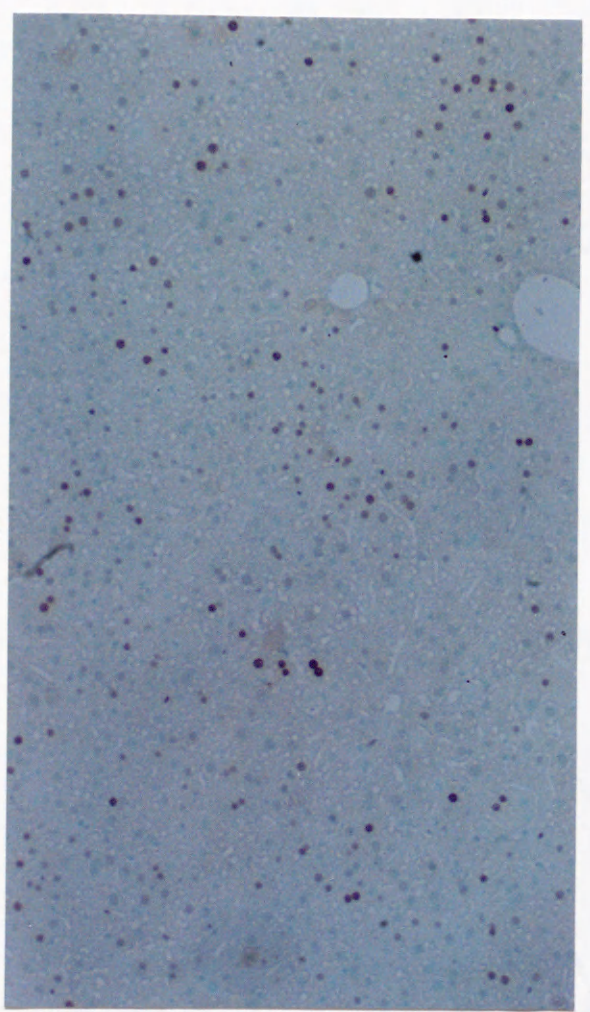


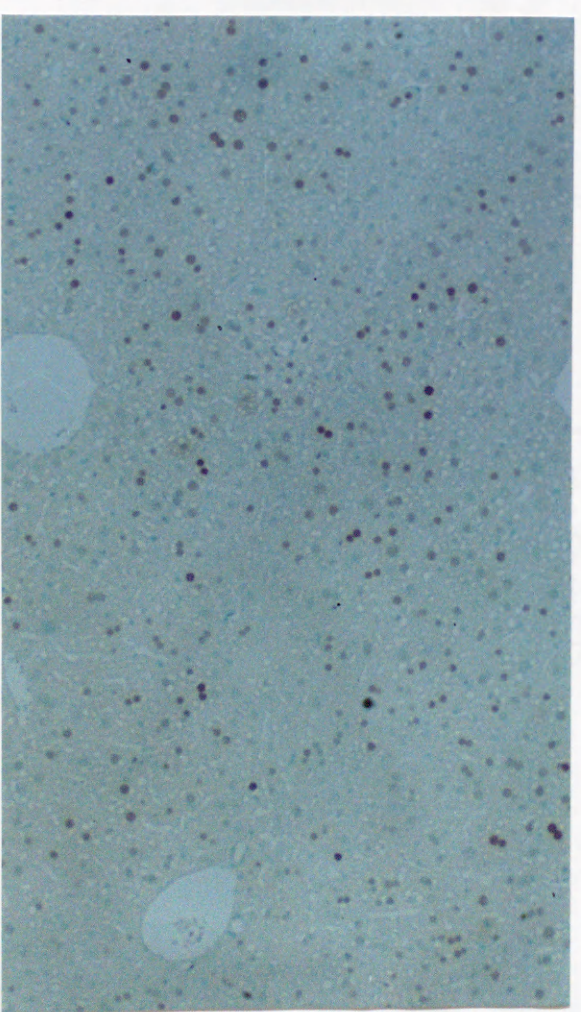
図18 PCNA免疫染色 (実験3-2)



HX群



Kd群



Tp群

部分肝切除36hr後

図19 再生肝体重比の推移 (実験3-3.)

(Hx群・Kd群：各n=7)

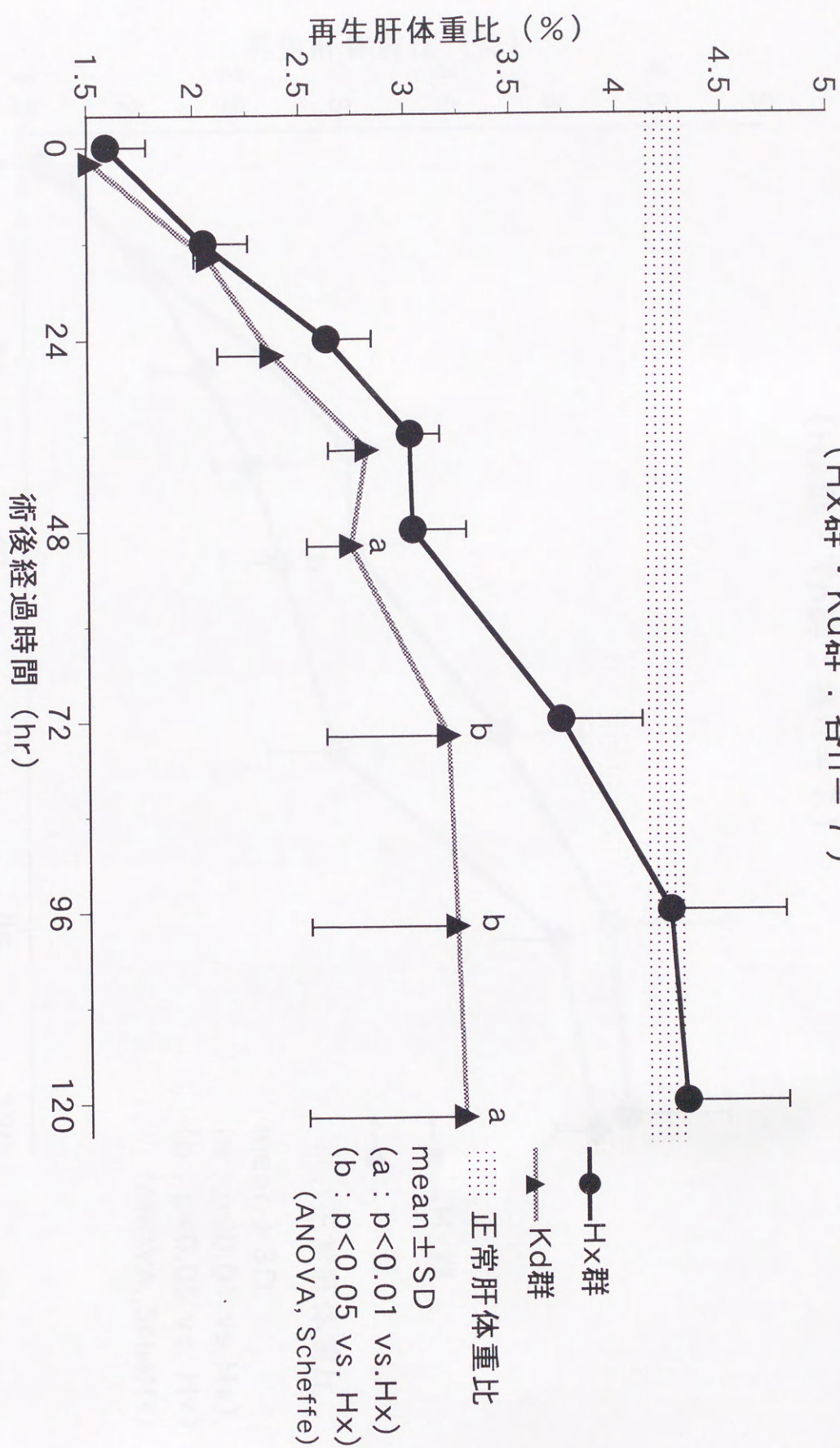


図20 再生肝体重比の推移 (実験3-3.)
(Hx群・Tp群：各n=7)

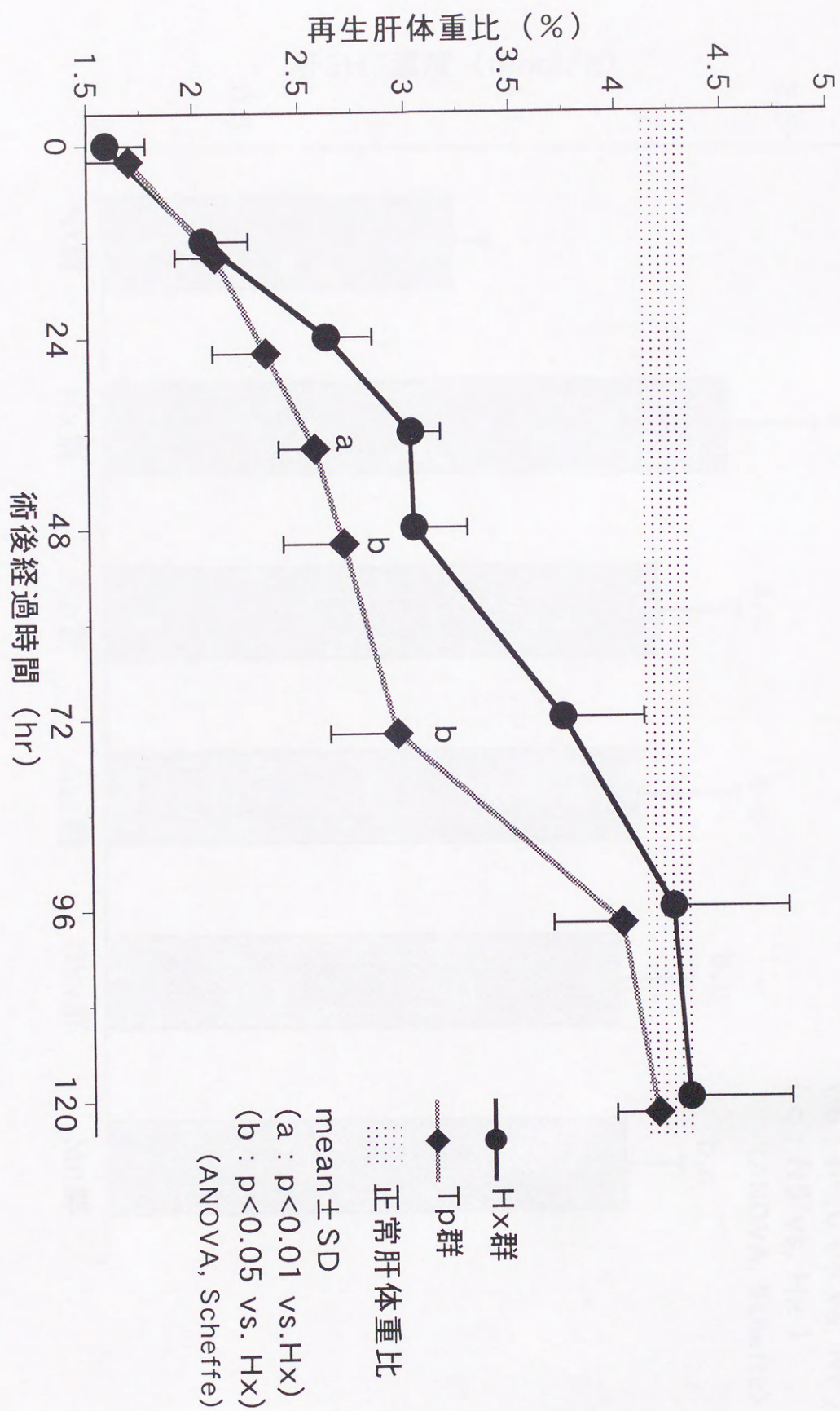


図21 5-HTの肝集積における抗凝固剤の影響 (実験4)

(70%部分肝切除後4時間 : $n=5$)

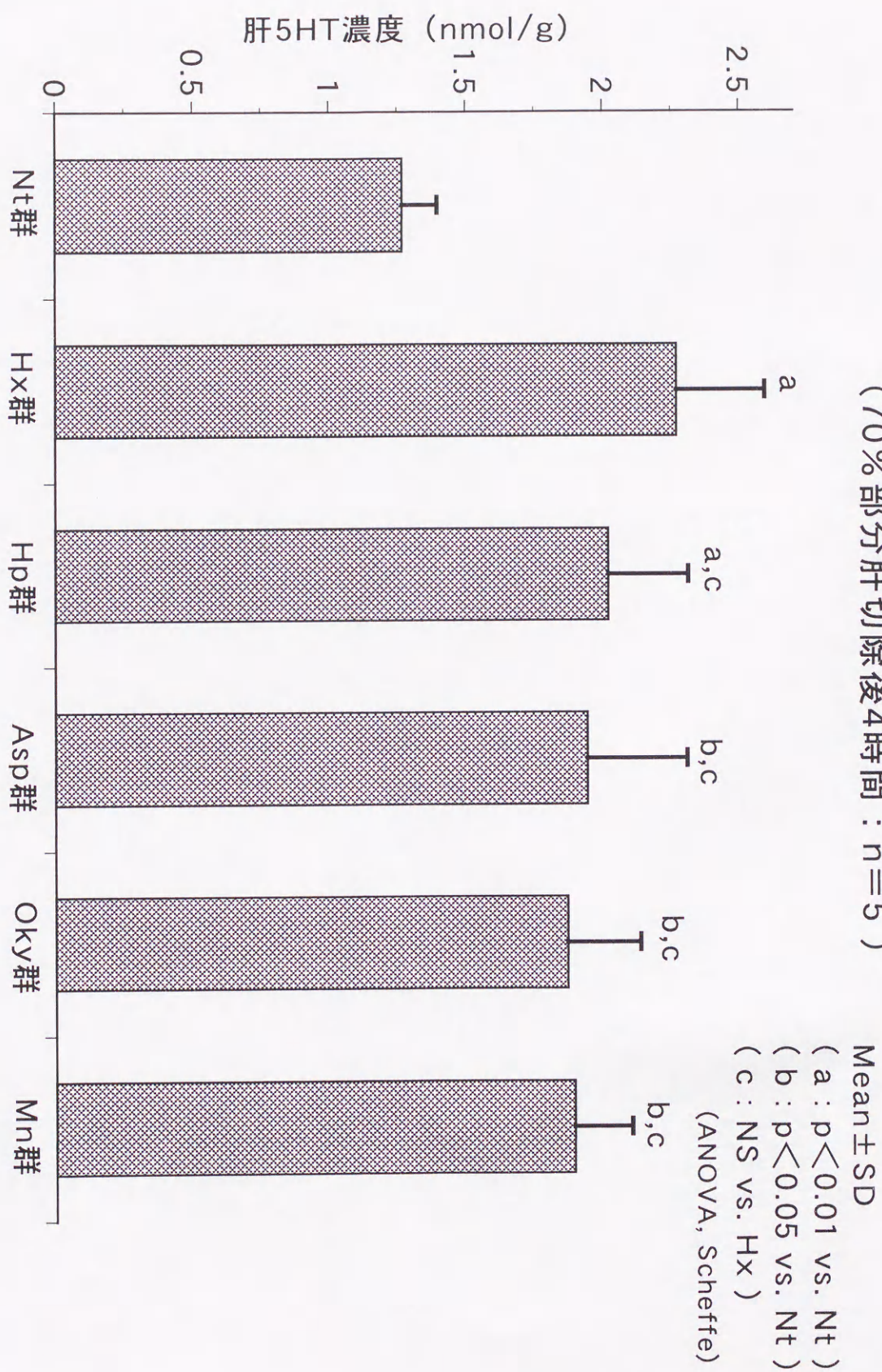


図5-1 2-H-Tの肝臓中における濃度の時間経過 (4 週) (Mean ± SD)

